

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger

Angefertigt in der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Pannen  
(Priv.-Doz. Dr. rer. nat. I. Bauer)

**Zur Bedeutung der Kation-Chlorid-Cotransporter NKCC1 und KCC2 und deren  
möglicher Regulatoren CIP1 und WNK3 für das Entstehen von chronischem  
Schmerz. Eine molekularbiologische Untersuchung im lumbalen Rückenmark  
und in lumbalen Spinalganglien von Ratten mit CFA-induziertem  
inflammatorischen und CCI-induziertem neuropathischen Schmerzgeschehen.**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

von Ines Buhl, geb. Hammesfahr  
aus Essen

München 2015

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians- Universität München.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Manfred Stangassinger

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Heidrun Potschka

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Et homines animalia.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VIII
Abkürzungen .....	IX
1 Einleitung .....	1
1.1 Physiologie der Nozizeption.....	3
1.2 Kation-Chlorid-Cotransporter (KCCs) und ihre Regulation .....	9
1.2.1 Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 1 (NKCC1) .....	10
1.2.2 Kalium-Chlorid-Cotransporter 2 (KCC2) .....	12
1.2.3 <i>Cation-Chlorid-Cotransporter Interacting Protein 1 (CIP1)</i> .....	13
1.2.4 <i>With No Lysine Kinase 3 (WNK3)</i> .....	13
1.3 Inflammatorischer Schmerz .....	15
1.3.1 Definition.....	15
1.3.2 Klinik .....	15
1.3.3 Pathophysiologie .....	15
1.3.4 Therapie.....	17
1.4 Neuropathischer Schmerz .....	18
1.4.1 Definition.....	18
1.4.2 Klinik .....	18
1.4.3 Pathophysiologie .....	22
1.4.3.1 Periphere Sensibilisierung .....	22
1.4.3.2 Zentrale Sensibilisierung.....	24
1.4.4 Therapie.....	27
1.5 Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen .....	30
2 Material und Methoden .....	32
2.1 Versuchstiere .....	32
2.2 Operative Maßnahmen .....	34
2.2.1 Auslösung inflammatorischer Schmerzen mittels einer Injektion von <i>Complete Freund's Adjuvant</i> (CFA) („inflammatorisches Schmerzmodell“).....	34
2.2.1.1 Vor- und Nachbereitung des Eingriffes .....	34
2.2.1.2 Durchführung der <i>Complete Freund's Adjuvant</i> Injektion.....	34

## Inhaltsverzeichnis

2.2.2	Auslösung neuropathischer Schmerzen mittels <i>Chronic Constriction Injury</i> (CCI) („neuropathisches Schmerzmodell“)	35
2.2.2.1	Vor- und Nachbereitung des Eingriffes	35
2.2.2.2	Durchführung der <i>Chronic Constriction Injury</i> (CCI)	36
2.3	Verhaltenstestmethoden	38
2.3.1	Allgemeine Vorgehensweise	38
2.3.2	Testung auf mechanische Allodynie mittels des Dynamic Plantar Aesthesiometer®	39
2.3.3	Testung auf thermale Hyperalgesie mittels des Plantar Test®	40
2.4	Versuchsprotokoll	43
2.5	Molekularbiologische Untersuchungen	45
2.5.1	Analyse der mRNA-Expression spezifischer Zielgene mittels rtqPCR	45
2.5.1.1	RNA-Isolierung	45
2.5.1.2	RNA-Konzentrationsbestimmung	47
2.5.1.3	Überprüfung der RNA-Intaktheit	47
2.5.1.4	Umschreibung von RNA in cDNA	49
2.5.1.5	Durchführung der rtqPCR	51
2.5.1.6	Auswertung der rtqPCR	54
2.5.2	Proteinanalyse mittels Western Blot	54
2.5.2.1	Probenaufbereitung	55
2.5.2.2	Quantifizierung des Proteingehaltes	55
2.5.2.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
2.5.2.4	Proteintransfer	58
2.5.2.5	Kontrolle der Gelelektrophorese mittels <i>Coomassie Blue</i>	59
2.5.2.6	Blocken und Immunfärbung der Membran	59
2.5.2.7	Detektion der Proteinbanden	62
2.5.2.8	Auswertung der Proteinbanden spezifischen Immunoblots	62
2.6	Statistische Auswertung und graphische Datendarstellung	63
3	Ergebnisse	64
3.1	Verhaltensuntersuchungen	64
3.1.1	Ergebnisse zur Entwicklung mechanischer Allodynie	64
3.1.1.1	Mechanische Allodynie im „inflammatorischen Schmerzmodell“	64

## Inhaltsverzeichnis

3.1.1.2	Mechanische Allodynie im „neuropathischen Schmerzmodell“ .....	67
3.1.2	Ergebnisse zur Entwicklung thermaler Hyperalgesie .....	69
3.1.2.1	Thermale Hyperalgesie im „inflammatorischen Schmerzmodell“ .....	69
3.1.2.2	Thermale Hyperalgesie im „neuropathischen Schmerzmodell“ .....	71
3.2	mRNA-Expression spezifischer Zielgene für die Proteine NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 im Zusammenhang mit induzierten inflammatorischen oder induzierten neuropathischen Schmerzen .....	73
3.2.1	mRNA-Expression im „inflammatorischen Schmerzmodell“ .....	73
3.2.1.1	mRNA-Expression im lumbalen Rückenmark nach CFA-Injektion .....	73
3.2.1.2	mRNA-Expression in Spinalganglien (L4-L6) nach CFA-Injektion .....	74
3.2.2	mRNA-Expression im „neuropathischen Schmerzmodell“ .....	75
3.2.2.1	mRNA-Expression im lumbalen Rückenmark nach CCI .....	75
3.2.2.2	mRNA-Expression in Spinalganglien (L4-L6) nach CCI .....	76
3.3	Expression spezifischer Proteine (NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3) im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes im Zusammenhang mit induzierten inflammatorischen oder induzierten neuropathischen Schmerzen .....	78
3.3.1	Expression des Proteins NKCC1 .....	78
3.3.1.1	Expression des NKCC1-Proteins im „inflammatorischen Schmerzmodell“ .....	79
3.3.1.2	Expression des NKCC1-Proteins im „neuropathischen Schmerzmodell“ .....	80
3.3.2	Expression des Proteins KCC2 .....	82
3.3.2.1	Expression des KCC2-Proteins im „inflammatorischen Schmerzmodell“ .....	82
3.3.2.2	Expression des KCC2-Proteins im „neuropathischen Schmerzmodell“ .....	84
3.3.3	Expression des Proteins CIP1 .....	86
3.3.4	Expression des Proteins WNK3 .....	86
4	Diskussion .....	88
4.1	Zur Eignung der Tierversuche und der dabei gewählten experimentellen und laboranalytischen Vorgehensweise .....	88
4.1.1	Die Ratte als Versuchstier .....	88
4.1.2	Verhaltensuntersuchungen zur Schmerzerfassung .....	89

## Inhaltsverzeichnis

4.1.2.1	Zur Testung auf mechanische Allodynie mittels Dynamic Plantar Aesthesiometer® .....	89
4.1.2.2	Zur Testung auf thermale Hyperalgesie mittels Plantar Test® .....	90
4.1.3	Experimentelle Verfahren zur Schmerzinduktion .....	91
4.1.3.1	Inflammatorischer Schmerz mittels CFA-Injektion .....	91
4.1.3.2	Neuropathischer Schmerz mittels CCI-Operation .....	92
4.1.4	Molekularbiologische Untersuchungsmethoden .....	93
4.1.4.1	mRNA Analyse mittels rtqPCR .....	93
4.1.4.2	Proteinanalyse mittels Western Blot .....	94
4.2	Diskussion der Ergebnisse .....	96
4.2.1	Zum Nachweis von mechanischer Allodynie und thermaler Hyperalgesie im „inflammatorischen“ und im „neuropathischen Schmerzmodell“ .....	98
4.2.2	Zur mRNA-Expression für spezifische Proteine (NKCC1, KCC2) und potentieller Regulatoren (CIP1, WNK3) im „inflammatorischen“ und im „neuropathischen Schmerzmodell“ .....	104
4.2.3	Zur Expression spezifischer Proteine (NKCC1, KCC2) im „inflammatorischen“ und im „neuropathischen Schmerzmodell“ .....	109
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick .....	112
5	Zusammenfassung .....	114
6	Summary .....	117
7	Literaturverzeichnis .....	120
8	Anhang .....	132
8.1	Pain-Score .....	132
8.2	Chemikalienverzeichnis .....	133
9	Danksagung .....	135

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	NKCC1 und KCC2 regulieren die neuronale Chloridkonzentration.....	10
Abb. 2:	Graphische Darstellung von Hyperalgesie (A) und Allodynie (B) anhand der Schmerzantwort in Abhängigkeit von der Stimulusintensität.....	20
Abb. 3:	Schematische Darstellung der CCI.....	37
Abb. 4:	Schematische Darstellung der Teststelle für Berührungsempfindlichkeit an der rechten Hinterpfote (plantare Ansicht).....	38
Abb. 5:	Fotographische Darstellung des Versuchsaufbaus mit dem Dynamic Plantar Aesthesiometer® zur Testung der Entstehung einer mechanischen Allodynie .....	40
Abb. 6:	Fotographische Darstellung des Versuchsaufbaus für den Plantar Test® zur Darstellung der Entstehung einer thermalen Hyperalgesie .....	42
Abb. 7:	Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Behandlung, der Schmerztestung und der Gewebeentnahme .....	44
Abb. 8:	Schematische Darstellung der laboranalytischen Maßnahmen bis zur rtqPCR.....	45
Abb. 9:	RNA-Isolierung mittels Zentrifugation .....	46
Abb. 10:	Formel zur Berechnung der RNA-Konzentration nach Absorptionsspektrometrie .....	47
Abb. 11:	Beispiel einer Überprüfung der RNA-Intaktheit von sechs Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese und den dabei auftretenden typischen zwei Banden .....	49
Abb. 12:	Ablauf der <i>two-step</i> rtqPCR .....	50
Abb. 13:	Schematische Darstellung der Abspaltung des fluoreszierenden Reporterfarbstoffes .....	53
Abb. 14:	Auswertung der rtqPCR mittels der $\Delta\Delta CT$ -Methode.....	54
Abb. 15:	Auswertung der relativen Expressionsniveaus mittels REST.....	54
Abb. 16:	Schematische Darstellung der Abfolge der laboranalytischen Teilschritte der Western Blot Analyse .....	55
Abb. 17:	Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer mechanischen Allodynie an der linken CFA-behandelten Hinterpfote .....	66



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 18: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer mechanischer Allodynie an der rechten CFA-unbehandelten Hinterpfote.....	66
Abb. 19: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer mechanischen Allodynie an der linken CCI-behandelten Hinterpfote .....	68
Abb. 20: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer mechanischen Allodynie an der rechten CCI-unbehandelten Hinterpfote.....	68
Abb. 21: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie an der linken CFA-behandelten Hinterpfote .....	70
Abb. 22: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie an der rechten CFA-unbehandelten Hinterpfote .....	70
Abb. 23: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie an der linken CCI-behandelten Hinterpfote .....	72
Abb. 24: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie an der rechten CCI-unbehandelten Hinterpfote .....	72
Abb. 25: Mittlere (+ Standardfehler) relative mRNA-Expression spezifischer Zielgene im linken lumbalen Rückenmark nach CFA-Injektion im vorgegebenen Zeitverlauf .....	74
Abb. 26: Mittlere (+ Standardfehler) relative mRNA-Expression spezifischer Zielgene in den linken Spinalganglien (L4-L6) nach CFA-Injektion im vorgegebenen Zeitverlauf .....	75
Abb. 27: Mittlere (+ Standardfehler) relative mRNA-Expression spezifischer Zielgene im linken lumbalen Rückenmark nach CCI im vorgegebenen Zeitverlauf .....	76
Abb. 28: Mittlere (+ Standardfehler) relative mRNA-Expression spezifischer Zielgene in den linken Spinalganglien (L4-L6) nach CCI im vorgegebenen Zeitverlauf .....	77
Abb. 29: Beispielhafte Darstellung der NKCC1-Proteinexpression im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 12 nach CCI-Behandlung bei drei Tieren (C) und bei drei Sham-Tieren (S).....	78
Abb. 30: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des NKCC1-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 2 nach CFA-Injektion .....	79

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 31: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des NKCC1-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 12 nach CFA- Injektion .....	80
Abb. 32: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des NKCC1-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 2 nach CCI- Operation .....	81
Abb. 33: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des NKCC1-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 12 nach CCI- Operation .....	81
Abb. 34: Beispielhafte Darstellung der KCC2-Proteinexpression im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 12 nach CFA-Injektion bei drei Tieren (C) und bei drei Sham-Tieren (S) .....	82
Abb. 35: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des KCC2-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 2 nach CFA- Injektion .....	83
Abb. 36: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des KCC2-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 12 nach CFA- Injektion .....	84
Abb. 37: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des KCC2-Proteins im linken lumbalen Rückenmark am Tag 2 nach CCI-Operation .....	85
Abb. 38: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des KCC2-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 12 nach CCI- Operation .....	85

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Extra- und intrazelluläre Ionenkonzentrationen bei Haus- und Nutztieren .....	4
Tab. 2: Neuropathische Schmerzen als Begleiterscheinung diverser Erkrankungen bei Mensch und Tier .....	21
Tab. 3: Darstellung der verwendeten Tierzahl in den vier Versuchsgruppen.....	33
Tab. 4: Lösungen und Puffer zur Herstellung eines Gels zur Überprüfung der RNA-Intaktheit .....	48
Tab. 5: Zusammensetzung des <i>High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix</i> .....	49
Tab. 6: Reaktionsbedingungen zur Umschreibung von RNA in cDNA.....	50
Tab. 7: Verwendete <i>TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays</i> für die mRNA-Analyse mit rtqPCR .....	51
Tab. 8: DNA-Verdünnung mit RNase-freiem Wasser .....	52
Tab. 9: rtqPCR-Protokoll für NKCC1, KCC2, CIP1, WNK3 und $\beta$ -Aktin.....	52
Tab. 10: Zusammensetzung der beiden für die SDS-Page erforderlichen Gele .....	58
Tab. 11: Zusammensetzung der für die Proteinanalyse verwendeten Lösungen und Puffer .....	60
Tab. 12: Für die Proteinanalyse mittels Western Blot verwendeten Antikörper .....	61
Tab. 13: In Maus- und Rattengewebe getestete Antikörper für die Western Blot Analyse des Proteins WNK3.....	87
Tab. 14: Pain-Score.....	132

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
5-HT (5-Hydroxytryptamin)	Serotonin
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CCI	<i>Chronic Constriction Injury</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CIP1	<i>Cation-Chlorid-Cotransporter Interacting Protein 1</i>
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
cm	Zentimeter
COX	Cyclooxygenase
CRPS	<i>Complex Regional Pain Syndrome</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GABA	γ-Aminobuttersäure
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IL	Interleukin
K	Lysin
K <sup>+</sup>	Kalium
KCC	Kation-Chlorid-Cotransporter
KCC2	Kalium-Chlorid-Cotransporter 2
kDa	Kilodalton
L4-L6	vierter bis sechster Lendenwirbel

## Abkürzungen

lx	Lux
M	Mittelwert
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
MGM	Molekulargewichtsmarker
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
<i>N. ischiadicus</i>	<i>Nervus ischiadicus</i>
Na <sup>+</sup>	Natrium
NCC	Natrium-Chlorid-Cotransporter
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NKCC1	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 1
nm	Nanometer
NSAID	Nicht-steroidales Antiphlogistikum
ø	Durchmesser
OSR1	<i>Oxidative Stress-Responsive Kinase</i>
PAD	Primär afferente Depolarisation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PWL	<i>Paw Withdrawal Latency</i>
PWT	<i>Paw Withdrawal Threshold</i>
REST	<i>Relative Expression Software Tool</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rtqPCR	<i>real-time</i> quantitative Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunden
SCI	<i>Spinal Cord Injury</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

## Abkürzungen

SE	Standardfehler
SMP	<i>Sympathetically Maintained Pain</i>
SNL	<i>Spinal Nerven Ligation</i>
SPAK	<i>Ste20-Related Kinase</i>
TCA	Trizyklisches Antidepressivum
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Nekrose Factor-<math>\alpha</math></i>
TRPV1	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>
UDG	Uracil-DNA Glycosylase
UP	<i>Ultra Pure</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
WNK3	<i>With No Lysine Kinase 3</i>
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 Einleitung

Patienten mit chronischen Schmerzen erfahren eine erhebliche Beeinträchtigung ihrer Lebensqualität (DWORKIN et al., 2003). Eine adäquate Schmerztherapie ist somit wesentlich für die Verbesserung der Lebensqualität von Schmerzpatienten (SARZI-PUTTINI et al., 2012). Die *International Association for the Study of Pain* (IASP) fordert in der *Declaration of Montréal*, dass Schmerztherapie ein grundlegendes Menschenrecht werden soll (COUSINS & LYNCH, 2011).

Die IASP definiert menschlichen Schmerz „als ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“ (MERSKEY & BUGDUK, 1994). Auf Grund der verschiedenen Verhaltensweisen und Kommunikationsmöglichkeiten von Mensch und Tier ist es nötig, die Definition von Schmerz bei Tieren entsprechend anzupassen. Die Beobachtung einer Schmerzreaktion bei Tieren beinhaltet pseudoaffektive Reaktionen wie Veränderungen von Herz- und Atemfrequenz, des Blutdrucks, Vermeidungsreaktionen sowie Lautäußerungen. Schmerz bei Tieren ist als „eine aversive sensorische Erfahrung, die durch aktuelle oder potentielle Verletzungen verursacht wird, die protektive motorische oder vegetative Reaktionen auslöst, zur erlernten Vermeidung solcher Reize führt und somit das Verhalten modifiziert“ definiert (SANN, 2005. In: ENGELHARDT & BREVES, S. 74-79).

Um eine adäquate Schmerztherapie leisten zu können, ist es wichtig, durch Grundlagenforschung Kenntnisse über die Mechanismen der Entstehung von Schmerzen zu gewinnen. Diese Arbeit versucht einen möglichen Entstehungsmechanismus von inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen zu erfassen und zu beschreiben.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit konzentrieren sich deshalb auf die Kation-Chlorid-Cotransporter NKCC1 und KCC2, sowie ihrer potentiellen Regulatoren *Cation-Chlorid-Cotransporter Interacting Protein 1* (CIP1) und *With No Lysine Kinase 3* (WNK3). Kation-Chlorid-Cotransporter nehmen über die Regulation der

## Einleitung

neuronalen Chloridhomöostase Einfluss auf die Schmerzentstehung. Somit bieten die Kation-Chlorid-Cotransporter einen möglichen Ansatzpunkt für eine verbesserte Schmerztherapie (PRICE et al., 2005).



## 1.1 Physiologie der Nozizeption

Die Nozizeption ist ein physiologischer Prozess und ermöglicht es dem Körper, schädigende Einflüsse zu erkennen und sich durch reaktive Verhaltensänderung vor diesen zu schützen (SANN, 2005. In: ENGELHARDT & BREVES, S. 74-79). Nozizeptiver Schmerz entsteht durch das Einwirken einer Noxe am Nozizeptor (SCHAIBLE, 2007).

Die Erkennung einer Noxe im innervierten Gewebe erfolgt an freien peripheren sensorischen Endigungen, den Nozizeptoren (HAGGARD et al., 2013). In der folgenden Transduktion wird die Reizerkennung durch die depolarisierende Öffnung von Kationenkanälen in ein Rezeptorpotential übertragen, das sich elektrotonisch bis zum Erreichen der sogenannten Triggerzone ausbreitet, um dort bei Schwellenwertüberschreitung in ein Aktionspotential transformiert zu werden. Hebt das eintreffende Rezeptorpotential das Ruhemembranpotential (-70 bis -90 mV bei Säugetieren) über seinen Schwellenwert (-50 bis -60 mV), erfolgt die Depolarisation (+30 bis +50 mV) des Neurons. Durch die Änderung des Membranpotentials öffnen sich transmembranöse, spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle, die somit die Membranpermeabilität für Natrium erhöhen. Getrieben durch die negative Ladung der Zellmembran innen und den hohen Konzentrationsgradienten für  $\text{Na}^+$  zwischen Extra- und Intrazellulärraum (Tab. 1) erfolgt ein plötzlicher, zeitabhängiger Natriumeinstrom in die Zelle. Etwas langsamer als die Natriumkanäle reagieren transmembranöse, spannungsabhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle und öffnen sich. Auf Grund des hohen nach extrazellulär gerichteten Konzentrationsgradienten (Tab. 1) strömt Kalium aus der Zelle hinaus und verursacht nach dem Schließen der  $\text{Na}^+$ -Kanäle die Repolarisation des Membranpotentials mit nachfolgendem hyperpolarisierendem Nachpotential, das durch ein langsames Schließen der  $\text{K}^+$ -Kanäle hervorgerufen wird (SCHRÖDER & SCHEMANN, 2005. In: ENGELHARDT & BREVES, S. 22-42).

## Einleitung

**Tab. 1: Extra- und intrazelluläre Ionenkonzentrationen bei Haus- und Nutztieren**

(modifiziert nach SCHRÖDER & DIENER, 2005. In: ENGELHARDT & BREVES, S. 5-21)

<b>Ionenart</b>	<b>Extrazelluläre Konzentration</b>	<b>Intrazelluläre Konzentration</b>	<b>Verhältnis extrazellulär: intrazellulär</b>
Na <sup>+</sup>	142 mmol/l	10 (8-30) mmol/l	14:1
K <sup>+</sup>	4 mmol/l	155 (100-155) mmol/l	1:39
Ca <sup>2+</sup>	2,5 mmol/l	0,1-1,0 µmol/l	>2500:1
Cl <sup>-</sup>	103 mmol/l	4 (4-30) mmol/l	26:1

Für den Menschen liegen vergleichbare Werte vor (DUDEL, 1990. In: SCHMITD & THEWS, S. 2-19).

Drei verschiedene Nervenfasertypen ermöglichen die differenzierte Weiterleitung sensorischer Informationen:

- Aβ-Fasern sind stark myelinisiert, haben einen großen Faserdurchmesser und leiten Aktionspotentiale schnell weiter. Sie haben eine niedrige Reizschwelle und vermitteln taktile Reize.
- Aδ-Fasern sind weniger myelinisiert und haben einen geringeren Faserdurchmesser als Aβ-Fasern und leiten Aktionspotentiale langsamer weiter. Sie besitzen eine höhere Reizschwelle und nehmen thermale und mechanische Reize wahr.
- C-Fasern sind nicht myelinisiert und haben den kleinsten Faserdurchmesser, sodass sie Aktionspotentiale langsam weiterleiten. Sie haben eine hohe Reizschwelle und erkennen schmerzhafte Reize.

Die Schmerzwahrnehmung vermitteln die Aδ- und C-Fasern, indem sie auf mechanische, thermale oder chemische Noxen reagieren (D'MELLO & DICKENSON, 2008). Allerdings scheint eine Beteiligung von Aβ-Fasern an der Nozizeption wahrscheinlich (BURGESS & PERL, 1967; DJOUHRI & LAWSON, 2004). Darüber hinaus sind im innervierten Gewebe unter physiologischen Bedingungen mechanoinsensitive Nozizeptoren eingebettet, die jedoch bei pathologischen Gewebeveränderungen aktiviert und für mechanische Reizeinwirkungen sensibel werden (SCHAIBLE, 2007).

Es erfolgt die afferente Weiterleitung des Aktionspotentials über den im Spinalganglion liegenden Zellkörper bis zur Umschaltung über Interneurone in das

Dorsalhorn des Rückenmarkes (SANN, 2005. In: ENGELHARDT & BREVES, S. 74-79). Die Schmerz vermittelnden A $\delta$ - und C-Fasern enden überwiegend in *Laminae* I-II des Dorsalhorns, wohingegen A $\beta$ -Fasern sowie wenige A $\delta$ - und C-Fasern bis in die tiefer liegenden *Laminae* III-IV reichen. Im Rückenmark nehmen verschiedene Neuronentypen die von A $\beta$ -, A $\delta$ - und C-Fasern vermittelten sensorischen Informationen auf. Oberflächliche, spezifisch nozizeptive Zellen empfangen die Informationen von oberflächlichen A $\delta$ - und C-Fasern, während über A $\beta$ -Fasern propriozeptive Zellen angesprochen werden. *Wide Dynamic Range Neurons* nehmen von allen drei Fasertypen Reizinformationen auf und geben ihre Aktionspotentiale weiter (D'MELLO & DICKENSON, 2008). Die Informationsübermittlung läuft über das thalamokortikale System, um eine bewusste Schmerzantwort hervorrufen zu können. Über das laterale thalamokortikale System erfolgt die Projektion der Reizinformationen auf die somatosensorische Hirnrinde, wo der einwirkende Reiz erkannt und lokalisiert wird. Das mediale thalamokortikale System hingegen erzeugt die affektive Reaktion auf den Schmerzreiz (SCHAIBLE, 2007). Über die rostrale, ventrale Medulla des Hirnstammes wird die Schmerzinformation über efferente Bahnen zurück in das Dorsalhorn geleitet (D'MELLO & DICKENSON, 2008). Als Reaktion wird über efferente motorische Bahnen, die das Rückenmark über das Ventralhorn verlassen, eine reaktive Verhaltensmodulation verursacht (SANN, 2005. In: ENGELHARDT & BREVES, S. 74-79). Vom Hirnstamm ausgehend ermöglicht ein antinozizeptives Kontrollsystem die deszendierende Hemmung der Reizinformation (KWON et al., 2013).

Die intrazelluläre Chloridkonzentration hat wesentlichen Einfluss auf die Neurotransmission (KAHLE et al., 2010). Die Umschaltung von Reizinformationen in Synapsen des Rückenmarkes wird durch eine Vielzahl erregender und hemmender Neurotransmitter moduliert. Während Glutamat der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter ist, ist  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) der wichtigste ubiquitär im ZNS vorkommende, inhibitorische Transmitter. GABA wird aus Glutamat decarboxyliert und vermittelt seine Wirkung über Bindung an seine Rezeptoren GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> und GABA<sub>C</sub> (FREY & LÖSCHER, 2005. In: ENGELHARDT & BREVES, S. 43-67). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen spielt der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor eine zentrale Rolle. GABA<sub>A</sub> liegt an einen Chloridkanal gebunden an der postsynaptischen Membran. GABA vermittelt seine inhibitorische Wirkung über

## Einleitung

Bindung an GABA<sub>A</sub>, sodass eine Öffnung des Chloridkanals hervorgerufen wird. Auf Grund des nach intrazellulär gerichteten Konzentrationsgradienten von Chlorid (Tab. 1) strömt Chlorid in die Zelle und hyperpolarisiert dadurch die Zellmembran (HÜBNER & HOLTHOFF, 2013). Bei Verschiebung des Chloridgradienten über sein Gleichgewichtspotential hinaus strömt bei der Bindung von GABA an seinen Rezeptor Chlorid aus dem Neuron und verursacht eine Depolarisation. GABA verliert seinen inhibitorischen Charakter und wirkt exzitatorisch (KAHLE et al., 2005).

Bei Neugeborenen wirkt GABA im ZNS exzitatorisch (KAHLE & STALEY, 2008). Diese *Developmental Shift* ist auf entwicklungsbedingte Expressionsveränderungen von Kation-Chlorid-Cotransportern zurückzuführen (MAO et al., 2012). Da in immaturren Neuronen das NKCC1-Expressionsniveau hoch, hingegen das KCC2-Expressionsniveau niedrig ist, ist die intrazelluläre Chloridkonzentration höher als bei Adulten (PRICE et al., 2005; KAHLE & STALEY, 2008). Es folgt nach Bindung von GABA an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor über den Chloridausstrom die Depolarisation des Neurons (PRICE et al., 2005). Der Wechsel von dieser exzitatorischen zur inhibitorischen Wirkung von GABA erfolgt mit dem Reifungsprozess der Neurone (HASBARGEN et al., 2010), indem die KCC2-Expression ansteigt, somit die neuronale Chloridkonzentration reduziert und bei GABA<sub>A</sub>-Bindung über den Chlorideinstrom eine Hyperpolarisation und Inhibition des Neurons verursacht (PRICE et al., 2005). Blaesse sieht diese Verallgemeinerung kritisch und verweist auf Untersuchungen, die zeigten, dass je nach Spezies Unterschiede in der postnatalen KCC2-Expression eine wichtige Rolle spielen (BLAESSE et al., 2009): Nesthocker, wie die Ratte, erfahren eine verzögerte postnatale KCC2-Expression in Neocortex und Hippocampus (RIVERA et al., 1999). Eine ähnliche Entwicklung wurde für den menschlichen Neocortex festgestellt (DZHALA et al., 2005; VANHATALO et al., 2005), wohingegen frühreife Spezies, wie das Meerschweinchen, eine hohe KCC2-Expression zeigen (BLAESSE et al., 2009). Die *splicing* Variante KCC2b scheint in der postnatalen Expressionsveränderung von KCC2 eine wichtige Rolle zu spielen (BLAESSE et al., 2009).

Im dorsalen Rückenmark findet eine präsynaptische Inhibition der afferenten Aktionspotentiale statt. Die *Gate Control* Theorie beschreibt, dass Aβ-Fasern die Transmitterausschüttung von Aδ- und C-Fasersignalen hemmen und somit die

## Einleitung

Schmerzwahrnehmung reduzieren können (MELZACK & WALL, 1965; PRICE et al., 2009). Salvenartige, primär afferente Aktionspotentiale rufen eine primäre afferente Depolarisation (PAD) im dorsalen Rückenmark hervor und verursachen so eine präsynaptische Hemmung. PAD ist vermutlich GABA-vermittelt, da primäre Afferenzen, durch eine erhöhte intrazelluläre Chloridkonzentration, bei GABA-Bindung an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor zur Zelldepolarisation führen (PRICE et al., 2005).

Neben präsynaptischen Mechanismen spielt die postsynaptische Hemmung ebenfalls eine wichtige Rolle. Im Dorsalhorn des Rückenmarkes wird die intraneuronale Chloridkonzentration durch Kation-Chlorid-Cotransporter reguliert. Expressionsveränderungen dieser Transporter beeinflussen die Chloridhomöostase und können zur Entstehung neuropathischer Schmerzen beitragen (PRICE et al., 2009).

Das nozizeptive System dient dem Körper als Schutzfunktion vor schädigenden Einflüssen. Nach besonders starken oder hochfrequenten Reizeinwirkungen wird die Reizschwelle für folgende Stimuli gesenkt, um das betroffene innervierte Areal durch Sensibilisierung schützen zu können. Sofern keine weitere Gewebereizung stattfindet, kehrt die Reizschwelle wieder auf ihren vorherigen Schwellenwert zurück. Diese reversible, gesteigerte Schutzfunktion beruht auf aktivitätsabhängiger Plastizität im zentralen Nervensystem, die bis zu mehrere Stunden nach dem Einwirken einer Noxe anhalten kann. Die aktivitätsabhängige, zentrale Sensibilisierung kann durch gesteigerte Membranerregbarkeit, gesteigerte Erregungsausbreitung und verminderte Hemmung im Dorsalhorn des Rückenmarkes verursacht werden. Diese schützende Phase der Sensibilisierung fördert die Schonung und Heilung des von der Noxe betroffenen Körperteils. Bleibt die zentrale Sensibilisierung über die erforderliche Zeit hinaus bestehen, entwickelt sie einen pathologischen Charakter. Sensibilisierung unterscheidet man in homosynaptische und heterosynaptische Sensibilisierung (LATREMOLIERE & WOOLF, 2009). Homosynaptische Sensibilisierung beschreibt die Potenzierung innerhalb einer Synapse, wozu auch das *Wind-up* Phänomen gehört. Das *Wind-up* Phänomen beschreibt eine kurzfristige Verstärkung von Aktionspotentialen, die durch die wiederholte Stimulierung von C-Fasern ausgelöst werden und innerhalb von Zehntelsekunden nach Stimulusbeendigung abklingen (SIVILOTTI et al., 1993; LATREMOLIERE & WOOLF,

## Einleitung

2009). Heterosynaptische Sensibilisierung bedeutet, dass eine aktivierte Synapse andere, nicht betroffene Synapsen aktiviert (LATREMOLIERE & WOOLF, 2009).

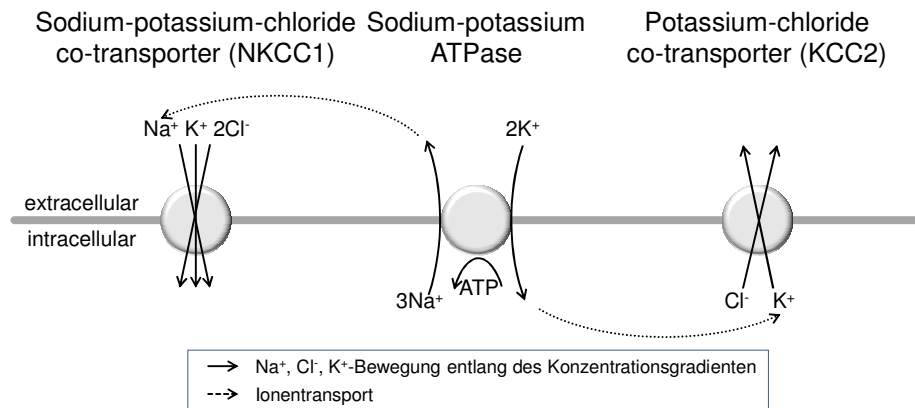
Treten pathologische Zustände, wie Verletzungen oder Entzündungen, im Gewebe auf, so können diese die Nozizeption modulieren und pathophysiologischen, nozizeptiven Schmerz auslösen (SCHAIBLE, 2007).

## 1.2 Kation-Chlorid-Cotransporter (KCCs) und ihre Regulation

Kation-Chlorid-Cotransporter (KCCs) spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des transmembranösen Chloridgradienten von Neuronen, der die GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte, hyperpolarisierende postsynaptische Hemmung ermöglicht (BLAESSE et al., 2009). Ihre Aktivität und Expression beeinflusst den Ionenfluss durch den GABA<sub>A</sub>-Kanal sowohl in seiner Quantität als auch in seiner Flussrichtung (PRICE et al., 2005).

KCCs werden bei Säugetieren durch die Gene *Slc12a1-9* kodiert. KCCs sind Glykoproteine und besitzen ein Molekulargewicht von 120-200 kDa (GAMBA, 2005; BLAESSE et al., 2009). KCCs werden durch die Tätigkeit der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase angetrieben und regulieren die intrazelluläre Chloridkonzentration elektroneutral (PAYNE et al., 2003; GAMBA, 2005). Die neun KCCs bestehen aus zwei Na-K-2Cl-Cotransportern (NKCCs mit den Isoformen NKCC1 und NKCC2), einem Na-Cl-Cotransporter (NCC) sowie vier K-Cl-Cotransportern (KCCs mit den Isoformen KCC1, KCC2, KCC3, KCC4). Diese sind funktionell gesehen transmembranöse Ionentransporter. Die Funktionen der restlichen KCCs (CIP1 und KCC9) sind bisher nicht genau bekannt (BLAESSE et al., 2009).

Wichtige Vertreter der KCCs sind der Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 1 (NKCC1) und der Kalium-Chlorid-Cotransporter 2 (KCC2) (PAYNE et al., 2003), die entgegengesetzt auf den Ionenfluss (Abb. 1) durch GABA<sub>A</sub> einwirken (PRICE et al., 2005). Beide Transporter werden in spezifischen Neuronen koexprimiert, sodass eine funktionelle Abhängigkeit voneinander möglich ist (PAYNE et al., 2003).



**Abb. 1: NKCC1 und KCC2 regulieren die neuronale Chloridkonzentration**

NKCC1 transportiert  $\text{Cl}^-$  in das Neuron, während KCC2  $\text{Cl}^-$  heraus transportiert. Das von NKCC1 transportierte  $\text{Cl}^-$  folgt  $\text{Na}^+$ , welches angetrieben durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase seinem Gradienten folgt. KCC2 transportiert  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$  dem  $\text{K}^+$ -Gradienten folgend hinaus. Beide Prozesse sind elektroneutral (modifiziert nach PRICE et al., 2009).

Pathologische Zustände können Einfluss auf die Expression von NKCC1 und von KCC2 nehmen und sich dadurch auf die Schmerzentstehung auswirken (KAHLE et al., 2010).

## 1.2.1 Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 1 (NKCC1)

NKCC1 wird ubiquitär im Körper exprimiert. Besonders hohe Expressionsniveaus liegen im zentralen Nervensystem vor, wo er in Neuronen, Gliazellen, Endothel und *Plexus choroideus* vorkommt (PLOTKIN et al., 1997; YAN et al., 2001). NKCC1 kommt transmembranös sowohl in unreifen und als auch reifen Neuronen vor und wird auch in Axonen exprimiert (KHIRUG et al., 2008). NKCC1 hat Einfluss auf den transmembranösen Chloridgradienten, indem er den Eintritt von  $\text{Cl}^-$  in das Neuron hinein ermöglicht (Abb. 1) (PRICE et al., 2009). NKCC1 tritt in zwei *splicing* Varianten auf, der NKCC1a und der NKCC1b, die sich an einer Phosphorylierungsstelle unterscheiden (VIBAT et al., 2001). Die Isoform NKCC2 wird hingegen nur in den Nieren exprimiert (PAYNE & FORBUSH, 1995).

Untersuchungen an NKCC1-Knock-out-Mäusen zeigten Taubheit (durch eine gestörte Endolymphproduktion), Gleichgewichtsstörungen, verminderten Blutdruck, Wachstumsverzögerung, gestörte Spermatogenese und eine veränderte Lokomotion



## Einleitung

(DELPIRE et al., 1999). Des Weiteren reagierten NKCC1-*Knock-out*-Mäuse mit Verzögerung auf Hitzereize, sodass ein Einfluss von NKCC1 auf die Schmerzwahrnehmung erkennbar wird (SUNG et al., 2000). Dieser Cotransporter scheint im Zusammenhang mit der Entwicklung von Allodynie zu stehen (PRICE et al., 2009).

Eine Aktivitätsänderung von NKCC1 kann durch Phosphorylierung des Proteins verursacht werden. Fällt die intrazelluläre Chloridkonzentration unter einen kritischen Wert (HAAS et al., 1995), so wird NKCC1 an seinem intrazellulären N-*Terminus* phosphoryliert (DARMAN & FORBUSH, 2002), um den intrazellulären Chloridspiegel wieder anheben zu können (PAYNE et al., 2003). Verschiedene Kinasen, wie z. B. WNK3, scheinen die NKCC1-Aktivität zu fördern (KAHLE et al., 2005; PRICE et al., 2009). Die Aktivität von NKCC1 wurde in *in vitro* Untersuchungen mittels Phosphorylierung durch WNK3 über *transducer* Kinasen gesteigert (DOWD & FORBUSH, 2003) und stellt einen interessanten Ansatzpunkt zur Regulation von NKCC1 dar.

Weiterhin scheint eine funktionelle NKCC1 Aktivitätssteigerung über seinen gesteigerten Transport in die neuronale Plasmamembran (*Protein Targeting*) im Dorsalhorn des Rückenmarkes möglich zu sein (GALAN & CERVERO, 2005; PRICE et al., 2009).

In kinetischen *in vitro* Untersuchungen an Erythrozyten führte eine Abnahme der intrazellulären Chloridkonzentration zur Aktivierung von WNKs, die NKCC1 und KCC2 phosphorylieren. Dabei wurde NKCC1 aktiviert und KCC2 inaktiviert. Umgekehrt verursachte eine hohe intrazelluläre Chloridkonzentration eine Dephosphorylierung von NKCC1 und KCC2. Damit wurde die Aktivität von NKCC1 vermindert und die von KCC2 gesteigert (PARKER, 1993; KAHLE et al., 2010).

Nach akuter Entzündung wird die NKCC1-Expression in primären Afferenzen gesteigert. Dadurch bedingt erhöht sich der intraneuronale Chloridspiegel, sodass bei nachfolgender GABA-Bindung ein depolarisierender Chloridausstrom hervorgerufen wird. NKCC1 scheint somit zur Schmerzentstehung beizutragen (PRICE et al., 2005).

Ein Blick in die Literatur (z.B. HAAS et al., 1995; PRICE et al., 2005; PRICE et al., 2009) zeigt, dass NKCC1 ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Schmerzen sein kann. Die Expression von NKCC1 selbst und auf NKCC1 Einfluss nehmende Faktoren sind hingegen unzureichend geklärt, sodass in dieser Arbeit NKCC1 weitergehend untersucht wurde.

### 1.2.2 Kalium-Chlorid-Cotransporter 2 (KCC2)

Die Kation-Chlorid-Cotransporter KCC1, KCC3, und KCC4 kommen in verschiedenen Geweben vor und werden im Nervengewebe nur wenig exprimiert (PAYNE et al., 2003). KCC2 ist nur in reifen Neuronen exprimiert (PAYNE et al., 1996) und überbrückt die Zellmembran an Soma und Dendriten (WILLIAMS et al., 1999). KCC2 existiert in zwei *splicing* Varianten, KCC2a und KCC2b, mit verschiedenen N-Termini (UVAROV et al., 2007).

KCC2 hat als Gegenspieler von NKCC1 ebenfalls Einfluss auf den transmembranösen Chloridgradienten, indem er Chlorid aus dem Neuron heraus transportiert (Abb. 1) (PRICE et al., 2009).

KCC2a- und KCC2b-*Knock-out*-Mäuse zeigen nach der Geburt motorische Beeinträchtigungen und versterben an Atemversagen. KCC2b-*Knock-out*-Mäuse zeigen eine auffällige Körperhaltung sowie Krämpfe und versterben in der dritten Lebenswoche (HÜBNER et al., 2001).

Nach peripherer Nervenläsion wird die KCC2-Expression im Dorsalhorn des Rückenmarkes reduziert und trägt zur Entstehung neuropathischer Schmerzen bei (NOMURA et al., 2006; PRICE et al., 2009). Die durch die Abnahme der KCC2-Expression entstehende GABAerge Enthemmung verursacht eine Änderung der intraneuronalen Chloridhomöostase. Durch die reduzierte KCC2-Expression verringert sich der Chloridausstrom aus dem Neuron und Chlorid sammelt sich in der Zelle an. Bei folgender GABA-Bindung an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor erfolgt, bei der gegebenen intrazellulär erhöhten Chloridkonzentration, eine Umkehr der Flussrichtung durch den GABA<sub>A</sub>-Kanal und Chlorid strömt aus der Zelle heraus (PRICE et al., 2005).

KCC2 scheint durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung in seiner Aktivität beeinflusst werden zu können. Ob KCC2 durch Veränderung seines Phosphorylationsstatus aktiviert oder gehemmt wird, ist davon abhängig, an welcher Stelle die Phosphorylierung erfolgt (KAHLE et al., 2013).

KCC2 scheint eine wichtige Rolle bei der Schmerzentstehung zu spielen (PRICE et al., 2005). Über die genauen Mechanismen dafür und über seine Regulatoren ist wenig bekannt. Dies veranlasste uns in dieser Arbeit, KCC2 auf seinen Zusammenhang mit der Schmerzentstehung zu überprüfen.

### **1.2.3 *Cation-Chlorid-Cotransporter Interacting Protein 1 (CIP1)***

Das *Cation-Chlorid-Cotransporter Interacting Protein 1* (CIP1) gehört zur Gruppe der KCCs. Es ist aber im Gegensatz zu NKCC1 und KCC2 kein eigentlicher Ionentransporter. Die Molekularstruktur gleicht den beiden Cotransportern NKCC1 und KCC2 in 25 % seiner Aminosäuren. CIP1 wird in verschiedenen neuronalen und nicht neuronalen Geweben neonataler und junger Ratten exprimiert (WENZ et al., 2009). In *in vitro* Untersuchungen an menschlichen embryonalen Nierenzellen und *Xenopus laevis* Oozyten hemmt CIP1 den NKCC1-vermittelten Chlorideinstrom (CARON et al., 2000) und steigert den KCC2-vermittelten Chloridausstrom (WENZ et al., 2009). D. h., CIP1 könnte im Zusammenhang mit der Expression von NKCC1 und KCC2 stehen und ein potentieller Regulator dieser Ionentransporter bei der Schmerzentstehung sein. Allerdings liegen hierfür bisher nur Untersuchungen aus *in vitro* Studien vor. Die *in vivo* Überprüfung von CIP1 in seiner Funktion als Regulator von NKCC1 und KCC2 im Zusammenhang mit Schmerzen verspricht wichtige wegweisende Erkenntnisse zu liefern. Es war deshalb naheliegend, auch CIP1 in dieser Arbeit zu untersuchen.

### **1.2.4 *With No Lysine Kinase 3 (WNK3)***

Die *With No Lysine* Kinasen (WNK) sind Serin-Threonin-Proteinkinasen (KAHLE et al., 2010), in deren aktivem Zentrum Lysin durch Cystein substituiert ist (RINEHART et al., 2005). In Säugetieren kommen vier verschiedene Isoformen vor, die als

## Einleitung

Osmosensoren fungieren (WNK1, WNK2, WNK3, WNK4). WNK3 ist an den *Intercellular Junctions* Chlorid transportierender Epithelien zu finden und als eine spezifische *splicing* Variante in den Neuronen des ZNS (KAHLE et al., 2010). Ähnlich wie KCC2 unterliegt auch WNK3 einer reifungsbedingten Steigerung seiner Expression innerhalb der ersten drei Lebenswochen (KAHLE et al., 2005). *In vitro* zeigt WNK3 indirekt über *transducer* Kinasen entgegengesetzte Wirkung auf NKCC1 und auf KCC2 (KAHLE et al., 2006; KAHLE et al., 2010), wobei eine Koloalisation mit NKCC1 und KCC2 besteht (KAHLE et al., 2005). So wird die Aktivität von NKCC1 durch WNK3 positiv, die Aktivität von KCC2 dagegen negativ beeinflusst. WNK3 selbst scheint durch eine verringerte intrazelluläre Chloridkonzentration angeregt zu werden. In der Literatur wird vermutet, dass Kenntnisse über den Einfluss von WNK3 auf KCCs zum Verständnis der Entstehung neuropathischer Schmerzen und zu einer verbesserten Therapie beitragen könnten (PONCE-CORIA et al., 2008; KAHLE et al., 2010).

Dies veranlasste uns in vorliegender Arbeit, *in vivo* den regulativen Einfluss von WNK3 auf NKCC1 und KCC2 eingehend zu untersuchen.

## 1.3 Inflammatorischer Schmerz

### 1.3.1 Definition

Das akute Entzündungsgeschehen ist die sofort einsetzende komplexe Schutzreaktion des Körpers auf eine Gewebeschädigung und soll die Gewebeheilung initiieren. Inflammatorischer Schmerz beugt weiterer Schädigung vor. Vom akuten inflammatorischen Schmerz abzugrenzen ist der chronisch inflammatorische Schmerz, der eine krankhafte Entwicklung darstellt (RAHMAN & DICKENSON, 2013). Eine Entzündung beinhaltet auch die Aktivierung von Immunzellen und deren Migration aus dem Blut an den Ort der Gewebeschädigung (TIZARD, 2004, S. 10-48).

### 1.3.2 Klinik

Das Entzündungsgeschehen beginnt innerhalb von wenigen Minuten nach dem Insult. Immunzellen setzen vasoaktive Moleküle frei, die eine Dilatation und auch eine erhöhte Permeabilität von Blutgefäßen hervorrufen. Jedes Entzündungsgeschehen kann anhand von fünf Kardinalsymptomen beschrieben werden: Dem Temperaturanstieg, der Rötung, der Schwellung, dem Schmerz und dem Funktionsverlust des geschädigten Gewebes. Patienten zeigen darüber hinaus ein sogenanntes *Sickness Behaviour*, wie Fieber, Appetitsverlust, Muskelschmerz, Übelkeit und Müdigkeit, die durch im Blut zirkulierende Produkte der Immunzellen verursacht werden (TIZARD, 2004, S. 10-48).

### 1.3.3 Pathophysiologie

Inflammatorischer Schmerz wird durch das komplexe Zusammenspiel verschiedener Zelltypen, Proteine und Rezeptoren hervorgerufen (RAHMAN & DICKENSON, 2013). Immunzellen erkennen Stoffe, die von geschädigten oder abgestorbenen Zellen abgegeben werden, binden diese und setzen Entzündungsmediatoren frei (TIZARD,

2004, S. 10-48), die Einfluss auf das Nervensystem und die Immunantwort nehmen (KHAN et al., 2013).

Diese Entzündungsmediatoren (z. B. *Nerve Growth Factor* (NGF), Serotonin (5-HT), Prostaglandine und Bradykinin) wandern in das geschädigte Gewebe und in seine Peripherie ein und verursachen über *Second-Messenger*-Kaskaden (SCHAIBLE, 2007) eine Sensibilisierung und Aktivierung peripherer Nozizeptoren (RAHMAN & DICKENSON, 2013). Bei der Sensibilisierung wird die Reizschwelle von Nozizeptoren primär sensorischer Afferenzen durch das Einwirken von Entzündungsmediatoren gesenkt (RAHMAN & DICKENSON, 2013), sodass sich membranständige Ionenkanäle schon bei einer niedrigeren Reizschwelle öffnen. D. h., Schmerzreize werden im entzündeten Gewebe früher wahrgenommen als im gesunden Gewebe. Weiterhin werden durch Entzündungsmediatoren zusätzlich mechanoinsensitive Nozizeptoren rekrutiert (SCHAIBLE, 2007), die dann zur Entstehung von inflammatorischem Schmerz, Hyperalgesie, Allodynie, Spontanschmerz und Hypersensibilität beitragen (RAHMAN & DICKENSON, 2013).

Eine Entzündung kann auch die Expressionsniveaus von Ionenkanälen auf sensorischen Nervenendigungen verändern. Insbesondere die davon betroffenen spannungsabhängigen Natrium- und Kalziumkanäle (RAHMAN & DICKENSON, 2013) und der Vanilloid 1-Rezeptor (TRPV1-Rezeptor) nehmen dann eine wichtige Stellung bei der Entstehung inflammatorischer Schmerzen ein (SCHAIBLE, 2007).

Angeregt durch eine periphere Gewebeentzündung modifizieren sensorische Neurone ihre neurochemische Funktion und lösen eine zentrale Sensibilisierung im ZNS aus. Die zentrale Sensibilisierung beruht auf einer Sensibilisierung des nozizeptiven Systems durch gesteigerte Erregbarkeit, sodass Schmerz und Hypersensibilität nach Entzündungen und Nervenschädigung aufrechterhalten werden. Bei entzündlicher Reizung ihrer Afferenzen setzen Spinalganglien schon bei geringer Reizstärke Neuropeptide in das Dorsalhorn des Rückenmarkes frei und initiieren dort die sogenannte zentrale Sensibilisierung. Ein weiterer Mechanismus ist die Steigerung der Prostaglandinsynthese im Dorsalhorn des Rückenmarkes durch die entzündungsbedingte Aktivierung der Cyclooxygenase 2 (COX-2), sodass die

Wirkung der hemmenden glyzinerger Neurotransmission verringert wird (LATREMOLIERE & WOOLF, 2009).

Durch periphere Entzündung werden Mikrogliazellen des Rückenmarkes angeregt, die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  freizusetzen. Diese aktivieren die COX-2 in Neuronen des Dorsalhorns, die dann hemmend auf die inhibitorische Neurotransmission und fördernd auf die exzitatorische Neurotransmission wirken, sodass die zentrale Sensibilisierung vorangetrieben wird (LATREMOLIERE & WOOLF, 2009).

### **1.3.4 Therapie**

Die Therapie akuter inflammatorischer Schmerzen erfolgt üblicher Weise mit nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs), Steroiden, Paracetamol oder Opioiden. Bei einzelner oder kombinierter Anwendung sprechen die Patienten meist gut auf diese Therapie an. Chronischer inflammatorischer Schmerz, wie im Zusammenhang mit Rheuma-, Arthritis- oder Tumorerkrankungen auftretend, hingegen erfordert einen komplexeren therapeutischen Ansatz. Hierbei werden meist antikonvulsive Therapeutika wie Gabapentin oder Pregabalin genutzt, die auch zur Therapie neuropathischer Schmerzen verwendet werden (RAHMAN & DICKENSON, 2013).

Es scheint, dass chronische inflammatorische Schmerzen Charakteristika entwickeln können, die ähnlich zu denen neuropathischer Schmerzen sind und eine angepasste Schmerztherapie erfordern (XU & YAKSH, 2011; RAHMAN & DICKENSON, 2013). Die Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen wird durch entzündliche Vorgänge wesentlich vorangetrieben (ELLIS & BENNETT, 2013). Dies veranlasste uns, vergleichende Untersuchungen zur Expression von Kation-Chlorid-Cotransportern und ihrer möglichen Regulatoren im Rahmen von inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen durchzuführen.

## **1.4 Neuropathischer Schmerz**

### **1.4.1 Definition**

Neuropathischer Schmerz wurde 2011 durch die IASP (*International Association for the Study of Pain*) in Anlehnung an TREEDE et al. (2008) als „Schmerz, der durch eine Läsion oder Erkrankung des somatosensorischen Nervensystems bedingt ist“ definiert. Neuropathischer Schmerz unterscheidet sich demzufolge von nozizeptivem oder inflammatorischem Schmerz und zwar dadurch, dass er durch Schädigung oder pathologische Veränderungen des zentralen oder peripheren Nervensystems hervorgerufen wird (FREYNHAGEN & BENNETT, 2009).

Neuropathischer Schmerz zeigt sich oftmals als Ursache chronischer Schmerzen (CAMPBELL & MEYER, 2006; FREYNHAGEN & BENNETT, 2009), die schwieriger zu behandeln sind als akute Schmerzen (DWORKIN, 2002). Patienten mit neuropathischen Schmerzen sind in ihrem Alltag oftmals stark beeinträchtigt (MAAG et al., 2006).

### **1.4.2 Klinik**

Die Prävalenz neuropathischer Schmerzen wird auf 6,9-10,0 % der weltweiten Bevölkerung geschätzt (VAN HECKE et al., 2013). Die Diagnostik neuropathischer Schmerzen erfordert große Sorgfalt, da es keine pathognomonischen Symptome gibt. In Ermangelung eines diagnostischen Tests auf neuropathischen Schmerz, basiert seine Erkennung auf der gründlichen Untersuchung der Patienten, hinsichtlich der Lokalisierung seiner auslösenden Nervenläsion sowie seiner Abgrenzung von nicht neuropathischen Einflüssen, wie z. B. entzündlichen, muskuloskelettalen oder psychologisch bedingten Vorgängen. Falls im vom lädierten Nerven innervierten Gebiet sowohl sensorische Positiv- als auch Negativsymptome auftreten, liegt die Diagnose neuropathischer Schmerz nahe (DWORKIN et al., 2003). Dies führte dazu, dass verschiedene diagnostische Fragebögen entwickelt wurden, die Patienten in der Humanmedizin zur Verfügung stehen (DWORKIN, 2002).



## Einleitung

Es ist anzunehmen, dass Patienten in der Veterinärmedizin neuropathischen Schmerz in ähnlicher Weise empfinden wie Menschen. Die Diagnose neuropathischer Schmerzen in der Veterinärmedizin basiert im Wesentlichen auf der Beobachtung des Verhaltens und dabei von schmerzbedingten Verhaltensänderungen (GRUBB, 2010). Anzeichen für Schmerz bei Tieren sind Veränderungen von Blutdruck, Herz- und Atemfrequenz sowie Lautäußerungen und Vermeidungsreaktionen (SANN, 2005. In: ENGELHARDT & BREVES, S. 74-79).

Das schlechte Ansprechen einer konventionellen Schmerztherapie beim Tier kann ebenfalls darauf hindeuten, dass es sich nicht um nozizeptiven, sondern um neuropathischen Schmerz handelt. Neuropathischer Schmerz wird nach Erhebung der Anamnese und Untersuchung des tiermedizinischen Patienten häufig als Ausschlussdiagnose gestellt (GRUBB, 2010).

Neuropathischer Schmerz kann sich beim Menschen durch verschiedene Symptome darstellen:

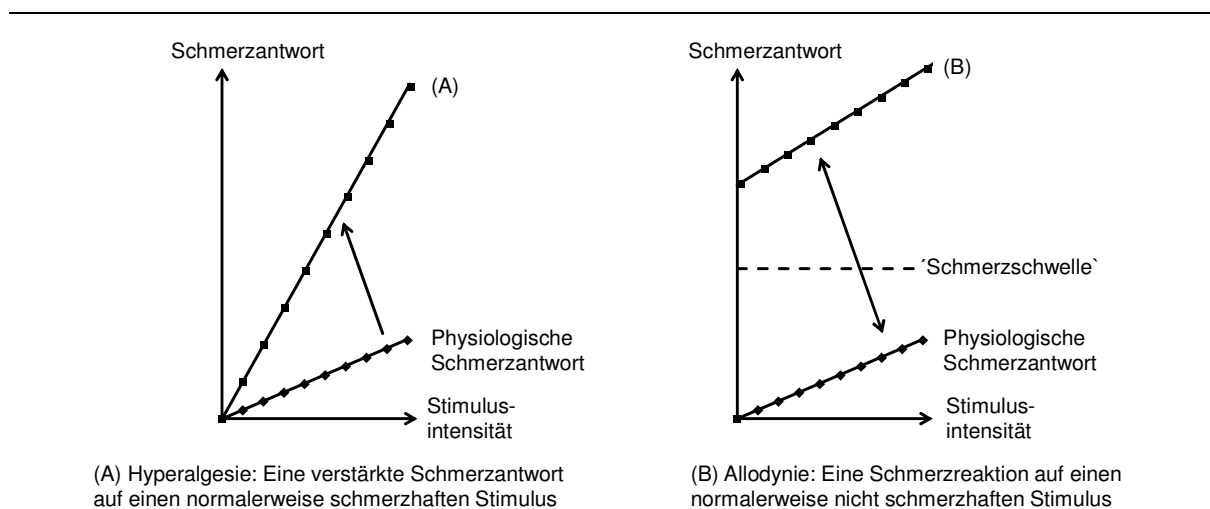
- Ausgedehnter nicht erklärbarer Schmerz (CAMPBELL & MEYER, 2006)
- Sensorische Defizite (CAMPBELL & MEYER, 2006)
- Brennender Schmerz (DWORKIN, 2002; CAMPBELL & MEYER, 2006; SCHAIBLE, 2007)
- Schmerz wie „elektrischer Strom“ (SCHAIBLE, 2007)
- Schmerz bereits bei leichtem taktilen Reiz (CAMPBELL & MEYER, 2006)
- Schmerzattacken ohne auslösenden Reiz (CAMPBELL & MEYER, 2006)
- Hypoalgesie (FREYNHAGEN & BENNETT, 2009)
- Unfähigkeit, warm und kalt zu unterscheiden (FREYNHAGEN & BENNETT, 2009)

Neuropathische Schmerzen können mit schwankender Intensität auftreten, kontinuierlichen oder intermittierenden Charakter haben und anfallsartig als plötzlich einschließender Schmerz auftreten (DWORKIN, 2002). Das Auftreten ist zudem individuell vom Patienten abhängig und dabei insbesondere vom betroffenen Nerv, vom Geschlecht und vom Alter. So kann die gleiche Nervenläsion bei verschiedenen Patienten eine sehr unterschiedliche Schmerzausprägung hervorrufen, von keinem bis hin zu starkem Schmerz (CAMPBELL & MEYER, 2006). Tiere können heftige

## Einleitung

Schmerzreaktionen auf einen Reiz zeigen, der manchmal weder vom Tierarzt noch vom Tierbesitzer als auslösender Stimulus erkannt wird (GRUBB, 2010).

Im Zusammenhang mit neuropathischen Schmerzen können Patienten paradoxe sensorische Wahrnehmungen zeigen, die sich in gesteigerter oder verminderter Antwort auf Stimuli äußern können. Zwei wichtige Ausprägungsformen von Hypersensibilität sind Hyperalgesie und Allodynie (Abb. 2). Hyperalgesie ist eine gesteigerte Schmerzempfindung auf einen schmerzhaften Reiz. Die Schmerzantwort kann hierbei durch einen thermischen - kalt oder warm - oder durch einen punktuellen mechanischen Reiz provoziert werden (DWORKIN et al., 2003). Allodynie hingegen ist die Schmerzempfindung auf einen nicht schmerzhaften Reiz. Bereits leichte Berührung der Haut durch dynamische oder statische mechanische sowie durch thermische Reize können eine Schmerzreaktion verursachen (DWORKIN et al., 2003; BARON et al., 2010).



**Abb. 2: Graphische Darstellung von Hyperalgesie (A) und Allodynie (B) anhand der Schmerzantwort in Abhängigkeit von der Stimulusintensität**

Die Reizintensität ist gegen die Schmerzantwort für noxische und nicht noxische Reize aufgetragen (modifiziert nach BRIDGES et al., 2001). Bei der Hyperalgesie (A) führt ein normalerweise schmerzhafter Stimulus zu einer stärkeren Schmerzreaktion. Bei der Allodynie (B) verschiebt sich die Schmerzschwelle, ein normalerweise nicht schmerzhafter Stimulus wird als schmerzhaft empfunden.

Neuropathische Schmerzen können bei verschiedenen Erkrankungen (Tab. 2) auftreten (CAMPBELL & MEYER, 2006). Bei Persistenz von neuropathischen Schmerzen kann sich aus dem ursprünglich eine Krankheit begleitenden

Schmerzgeschehen durch irreversible neuroplastische Umbauprozesse eine eigene Schmerzkrankheit entwickeln (MAAG et al., 2006).

**Tab. 2: Neuropathische Schmerzen als Begleiterscheinung diverser Erkrankungen bei Mensch und Tier**

<b>Krankheitstypen</b>	<b>Beispiele</b>
Autoimmunerkrankungen	<ul style="list-style-type: none"><li>• Multiple Sklerose (CAMPBELL &amp; MEYER, 2006)</li></ul>
Erbkrankheiten	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cavalier King Charles Spaniel Syringomyelie (SCHMIDT et al., 2013)</li><li>• Amyloidose (BARON et al., 2010)</li></ul>
Gefäßerkrankungen	<ul style="list-style-type: none"><li>• Schlaganfall (CAMPBELL &amp; MEYER, 2006)</li><li>• Aortenthrombus bei der Katze (GRUBB, 2010)</li></ul>
Infektionen	<ul style="list-style-type: none"><li>• Varizella Zoster Virus mit folgender postherpetischer Neuralgie (CAMPBELL &amp; MEYER, 2006)</li><li>• Humanes Immundefizienz-Virus mit folgender distal symmetrischer Polyneuropathie (SCHÜTZ &amp; ROBINSON-PAPP, 2013)</li></ul>
Intoxikationen	<ul style="list-style-type: none"><li>• Chemotherapie (FREYNHAGEN &amp; BENNETT, 2009)</li><li>• Antiretrovirale Medikamente (FREYNHAGEN &amp; BENNETT, 2009)</li></ul>
Metabolische Erkrankungen	<ul style="list-style-type: none"><li>• Diabetische Polyneuropathie (DYCK et al., 2000)</li><li>• Laminitis beim Pferd (DRIESSEN et al., 2010)</li></ul>

Trauma	<ul style="list-style-type: none"><li>• Trigeminusneuralgie (CAMPBELL &amp; MEYER, 2006)</li><li>• Bandscheibenvorfall (FREYNHAGEN &amp; BENNETT, 2009)</li></ul>
Tumorerkrankungen	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tumorbedingte Nerveninfiltration oder –kompression (DWORKIN et al., 2003)</li></ul>

### 1.4.3 Pathophysiologie

Neuropathischer Schmerz ist auf Grund seiner multifaktoriellen Ätiologie ein noch nicht vollständig verstandenes komplexes Geschehen (BARON et al., 2010). Er muss von nozizeptivem und auch von inflammatorischem Schmerz, wegen deutlich voneinander abweichender pathophysiologischer Vorgänge abgegrenzt werden (CAMPBELL & MEYER, 2006; MAAG et al., 2006). Neuropathischer Schmerz kann durch zahlreiche verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden. Insofern ist es sinnvoll, neuropathischen Schmerz auf Grund seiner zugrunde liegenden Pathophysiologie einzuteilen (DWORKIN, 2002).

Eine periphere Nervenschädigung mit neuropathischem Schmerz zieht molekulare und zelluläre Reaktionen auf peripherer aber auch auf zentraler Ebene nach sich, die dann zu einer peripheren und einer zentralen Sensibilisierung führen können (DWORKIN et al., 2003; MAAG et al., 2006).

#### 1.4.3.1 Periphere Sensibilisierung

Die Veränderungen der peripher afferenten Nozizeptoren rufen eine periphere Sensibilisierung hervor, die auf verschiedene mögliche Mechanismen zurückzuführen ist (MAAG et al., 2006).

## Einleitung

Wird ein Nerv beschädigt, entsteht ein Neurom, das Ausgangspunkt für die Bildung ektooper Aktionspotentiale sein kann (BLUMBERG & JÄNIG, 1984; CAMPBELL & MEYER, 2006).

Nach Axotomie von afferenten A-Fasern zeigen diese Spontanaktivität, jedoch nicht die C-Fasern, die eigentlich an der Entstehung von zentraler Sensibilisierung beteiligt sein sollen. Möglicherweise fördern A-Fasern nach einer Nervenläsion durch Spontanaktivität eine zentrale Sensibilisierung (LIU et al., 2000; DJOUHRI & LAWSON, 2004). Eine andere Möglichkeit wäre, dass A-Fasern nach einem *Phenotypic Switch* Spontanaktivität entwickeln können (CAMPBELL & MEYER, 2006).

Eine entzündliche Reaktion infolge einer Nervenschädigung rekrutiert Makrophagen in Nerven und Spinalganglien. Dieser Prozess führt zur Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine, wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Geschädigte und nicht geschädigte Nozizeptoren erzeugen, angeregt durch die proinflammatorischen Zytokine, ektope Aktionspotentiale (MAAG et al., 2006).

Beim Modell des *Sympathetically Maintained Pain* (SMP) erfahren Nozizeptoren, die von einer proximalen Nervenläsion unbeeinträchtigt sind, adrenerge Sensibilisierung (CAMPBELL & MEYER, 2006). Die gesteigerte Empfindlichkeit für adrenerge Substanzen wird durch eine erhöhte Expression von  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren auf ihren Hautafferenzen verursacht und steigert somit die Wirkung sympathischer Einflüsse (MAAG et al., 2006). In Untersuchungen bei *Complex Regional Pain Syndrome* (CRPS) Patienten konnte der  $\alpha$ -adrenerge Antagonist Phentolamin eine deutliche Schmerzreduktion hervorrufen (RAJA et al., 1991; CAMPBELL & MEYER, 2006).

Eine Nervenläsion zieht Veränderungen der Expression von trophischen Faktoren in den geschädigten Neuronen nach sich. Möglicherweise können die vermehrt vorkommenden trophischen Faktoren eine Überversorgung naheliegender unverletzter Nervenfasern verursachen. Die verletzten, vom übrigen Gewebe gelösten Fasern erfahren eine Unterversorgung, da sie nicht alle trophischen

Faktoren exprimieren können. Dieses Ungleichgewicht könnte zur Schmerzentstehung beitragen (CAMPBELL & MEYER, 2006).

Spannungsabhängige Natriumkanäle werden vermehrt auf afferenten C-Nozizeptoren und in den Neuronen der Spinalganglien exprimiert (DWORKIN et al., 2003; MAAG et al., 2006) und senken den Schwellenwert für Aktionspotentiale, so dass ektope Aktionspotentiale gebildet werden können (BARON et al., 2010).

Im Vergleich zu physiologischen Bedingungen kann eine verstärkte Expression von Rezeptorproteinen in der Zellmembran der Neurone zur Sensibilisierung beitragen. In tierexperimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Vanilloidrezeptor (TRPV1), aus der *Transient Receptor Potential Family*, nach einer Nervenläsion auf verletzten C-Fasern vermindert, hingegen auf intakten vermehrt exprimiert wird (MAAG et al., 2006; BARON et al., 2010). Zudem findet sich in den geschädigten Neuronen der Spinalganglien eine verstärkte Expression von TRPV1-Rezeptoren (MAAG et al., 2006). TRPV1 wird bei einer Temperatureinwirkung von über 41 °C auf die Nozizeptoren aktiviert. Veränderungen in seiner Expression können zu einer veränderten Schmerzwahrnehmung führen, indem die Aktivierungsschwelle von TRPV1 auf das Niveau der Körpertemperatur gesenkt wird (BARON et al., 2010).

### 1.4.3.2 Zentrale Sensibilisierung

Eine anhaltende durch Nervenläsion bedingte Hyperaktivität peripherer Nozizeptoren führt zur Induktion sekundärer Modulationen im zentralen Nervensystem (BARON, 2006). Diese zentrale Sensibilisierung führt zu einer verstärkten Schmerzantwort im Dorsalhorn des Rückenmarks, Thalamus und Cortex auf eintreffende Reize (CAMPBELL & MEYER, 2006).

Zentrale Sensibilisierung kann infolge einer Entzündung durch anhaltende Reizung der Nozizeptoren hervorgerufen werden. Eine ähnliche periphere Ursache für zentrale Sensibilisierung bei neuropathischen Schmerzen wird vermutet (CAMPBELL & MEYER, 2006). Eine Sonderform der homosynaptischen zentralen Sensibilisierung ist das *Wind-up* (LATREMOLIERE & WOOLF, 2009). Bei anhaltender niedrig

## Einleitung

frequenter Stimulation afferenter C-Fasern wird eine verstärkte Antwort der Neurone im Dorsalhorn hervorgerufen (CAMPBELL & MEYER, 2006).

Homosynaptische und heterosynaptische Sensibilisierung können durch verstärkte Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter oder durch deren gesteigerte Wirkung an der Synapse verursacht werden. Beide Vorgänge können durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden (CAMPBELL & MEYER, 2006):

Präsynaptische Mechanismen können auf Veränderungen in der Glutamatausschüttung, der Kalziumkanalaktivität oder dem Phänotyp von A $\beta$ -Fasern beruhen. Nach einer Nervenläsion werden  $\mu$ -Opioid Rezeptoren herunter reguliert, sodass ihr hemmender Einfluss auf die Glutamatfreisetzung verringert wird (KOHNO et al., 2005; CAMPBELL & MEYER, 2006). Spannungsabhängige Kalziumkanäle werden hingegen nach einer Nervenschädigung vermehrt in Spinalganglien exprimiert und verstärken somit die Glutamatausschüttung (LI et al., 2004; CAMPBELL & MEYER, 2006). Werden A $\beta$ -Fasern geschädigt, so scheinen sie die Fähigkeit zu erlangen, Substanz P freizusetzen, die sonst von C-Fasern freigesetzt wird, und tragen somit zur verstärkten Erregung im Dorsalhorn bei (NOGUCHI et al., 1994; CAMPBELL & MEYER, 2006).

Postsynaptische Mechanismen nach einem Nerveninsult können auf einer verstärkten Expression von Glutamatrezeptoren beruhen, die zu vermehrter Exzitation führt (HARRIS et al., 1996; CAMPBELL & MEYER, 2006; YOSHIMURA & YONEHARA, 2006).

Disinhibierende Mechanismen zeigen sich in einer verringerten Expression hemmender Rezeptoren an primären Afferenzen und postsynaptischen Neuronen infolge einer Nervenverletzung (KOHNO et al., 2005; CAMPBELL & MEYER, 2006). Zudem könnte die Apoptose hemmender GABAerger Interneurone zur Enthemmung beitragen (MOORE et al., 2002; CAMPBELL & MEYER, 2006). Eine periphere Nervenläsion induziert die Freisetzung von BDNF aus Mikroglia, wodurch die KCC2-Expression im Dorsalhorn des Rückenmarks reduziert wird (MILETIC & MILETIC, 2008; LATREMOLIERE & WOOLF, 2009). Somit verschiebt sich der transmembranöse Chloridgradient (BARON, 2006), sodass GABA seine

inhibitorische Funktion verliert und nun bei Bindung exzitatorisch wirkt (COULL et al., 2003; CAMPBELL & MEYER, 2006). Nach *Spinal Cord Injury*, einem Schmerzmodell zur Auslösung neuropathischer Schmerzen nach Quetschung des Rückenmarkes (HOGAN, 2002), kommt es zu einer gesteigerten NKCC1-Expression. Zusammen mit einer verminderten KCC2-Expression kann auf diesem Wege Einfluss auf die Entstehung neuropathischer Schmerzen genommen werden (CRAMER et al., 2008).

Im Rahmen der Sensibilisierung müssen auch deszendierende Mechanismen diskutiert werden, die im Kortex und Thalamus inhibitorische und exzitatorische Stimuli modulieren (PORRECA et al., 2001; CAMPBELL & MEYER, 2006). Ebenso sind supraspinale Mechanismen zu nennen, die Veränderungen bei der Verarbeitung von Schmerzinformationen im Kortex hervorrufen (MAIHÖFNER et al., 2004; CAMPBELL & MEYER, 2006).

Immunologische Mechanismen spielen sowohl bei inflammatorischen als auch neuropathischen Schmerzen eine wichtige Rolle. Man unterscheidet dabei zwischen peripheren und zentralen immunologischen Mechanismen. In der Peripherie nehmen Interleukine über ihre Rezeptoren Einfluss auf die Nozizeptoren. Nach einer Nervenläsion werden vermehrt proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet (CAMPBELL & MEYER, 2006). IL-1 $\beta$  steigert die NGF-Expression, die zur Sensibilisierung von Nozizeptoren beitragen kann (KANAAAN et al., 1998; CAMPBELL & MEYER, 2006). TNF- $\alpha$  kann die Aktivität von Nozizeptoren modulieren (SORKIN et al., 1997; CAMPBELL & MEYER, 2006) und ein Beitrag von IL-6 zur Entstehung von neuropathischen Schmerzen wird vermutet (OKAMOTO et al., 2001; CAMPBELL & MEYER, 2006). Zentral scheinen immunologische Vorgänge bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen eine wichtige Funktion einzunehmen (CAMPBELL & MEYER, 2006), indem eine verletzungsbedingte Aktivierung von Mikroglia zur Ausschüttung von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  führt (CAMPBELL & MEYER, 2006; INOUE, 2006).

Eine Sonderstellung bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen nimmt die Deafferenzierung ein. Patienten mit durchtrennten Hautnerven empfinden Schmerzen im nicht mehr innervierten Hautareal, was auf eine zentrale intrinsische Aktivität zurückzuführen sein könnte (BARON, 2006).



### 1.4.4 Therapie

Da neuropathische Schmerzen durch verschiedene Ursachen entstehen können, muss die Therapie an den jeweiligen Entstehungsmechanismus angepasst werden (CAMPBELL & MEYER, 2006). Ebenso müssen psychische und emotionale Komponenten berücksichtigt werden (BARON et al., 2010). Herkömmliche Analgetika führen oft nicht zu einer befriedigenden Schmerzlinderung (FREYNHAGEN & BENNETT, 2009), sodass Koanalgetika zur Therapie ergänzt werden (BAIR & SANDERSON, 2011). Oftmals bringt erst eine Kombination verschiedener Medikamente einen Therapieerfolg (FREYNHAGEN & BENNETT, 2009).

In der Veterinärmedizin sind auch speziesbedingte Unterschiede in der Ansprechbarkeit, Verträglichkeit oder Zulassung von Medikamenten zu beachten. Bei mangelnder Kooperation tierischer Patienten sind zudem geeignete, den Tierbesitzer nicht überfordernde Applikationswege für Medikamente erforderlich (GRUBB, 2010).

Mittel der Wahl zur Behandlung peripherer und zentral bedingter neuropathischer Schmerzen sind Antikonvulsiva (z. B. Gabapentin, Pregabalin). Über Bindung von Gabapentin und Pregabalin an die zentrale Endigung primär afferenter Nozizeptoren reduzieren sie die Neurotransmitterausschüttung von Glutamat, Noradrenalin und Substanz P (BARON et al., 2010). Gabapentin lindert effektiv Schmerzen, zeigt wenig Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten und wirkt sich positiv auf die Lebensqualität der Patienten aus. Gabapentin erfordert allerdings eine genaue Dosierung, um insbesondere eine Sedierung als Nebenwirkung einzugrenzen (DWORKIN et al., 2003).

Trizyklische Antidepressiva (TCAs) eignen sich ebenfalls zur Therapie neuropathischer Schmerzen, wobei sekundäre trizyklische Antidepressiva (Nortriptylin, Desipramin) eine bessere Verträglichkeit beim Menschen auszeichnet als tertiäre (Amitriptylin, Imipramin, Clomipramin) (FREYNHAGEN & BENNETT, 2009). Für ältere Menschen mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen sollten TCAs, auf Grund von Neben- und Wechselwirkungen, besonders vorsichtig angewendet werden (DWORKIN et al., 2003). In der Tiermedizin werden meist Imipramin oder

## Einleitung

Amitriptylin verwendet. TCAs verhindern die Wiederaufnahme von Serotonin und Noradrenalin und verlängern somit ihre Wirkungsdauer (GRUBB, 2010).

Serotonin- und Noradrenalin- Wiederaufnahmehemmer (Duloxetin, Venlafaxin) können zur Therapie von Polyneuropathien wirksam eingesetzt werden (BARON et al., 2010). Zur Verwendung in der Veterinärmedizin liegen bisher keine Untersuchungen vor (GRUBB, 2010).

Bei lokalen, peripheren neuropathischen Schmerzen erlauben 5 % Lidocain-Pflaster eine sichere Anwendung (DWORKIN et al., 2003; FREYNHAGEN & BENNETT, 2009). Besonders bei älteren Patienten ermöglichen Lidocain-Pflaster eine Reduktion anderer eingesetzter Analgetika und Koanalgetika (DELORME et al., 2011).

Des Weiteren stehen Opioide (Morphin, Oxykodon, Tramadol) zur Verfügung (FREYNHAGEN & BENNETT, 2009), die über prä- als auch postsynaptische Bindung an Opioidrezeptoren agieren (BARON et al., 2010). Ihr Einsatz ist auf Grund ihres hohen Suchtpotentials und weiterer Nebenwirkungen abzuwägen. Bei schwerwiegendem, akuten neuropathischen Schmerz stellen sie auch das Mittel der Wahl dar (FREYNHAGEN & BENNETT, 2009).

Sofern vorangegangene Therapieversuche keine ausreichende Schmerzlinderung brachten, können nicht-steroidale Antiphlogistika (Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Naproxen, Ibuprofen) in Betracht gezogen werden (FREYNHAGEN & BENNETT, 2009), die den inflammatorischen Beitrag an neuropathischen Schmerzen reduzieren (GRUBB, 2010). Cannabinoide zeigten in Untersuchungen sowohl eine Schmerzlinderung als auch eine Verstärkung der Schmerzsymptome bei Patienten mit multipler Sklerose (SOLARO et al., 2013).

Um eine erfolgreiche Therapie zu ermöglichen, muss für jeden Patienten individuell eine ausreichende Analgesie unter Berücksichtigung von Neben- und Wechselwirkungen des verwendeten Präparates sowie möglicher Begleiterkrankungen ermittelt werden (BARON et al., 2010). Neben der pharmakologischen Therapie wird nach nicht pharmakologischen Therapieansätzen gesucht. Chirurgische und chemische Sympathektomie zeigten sich bisher nicht als

## Einleitung

gleichwertige Alternative zur pharmakologischen Intervention. Neurostimulation, transkutane Nervstimulation und Elektroakupunktur scheinen einen positiven Effekt zu haben (FREYNHAGEN & BENNETT, 2009). Akupunktur, Massagen und kalte oder warme Thermotherapie können bei Tieren ebenfalls Schmerzlinderung bringen. Allerdings kann Thermotherapie in Patienten auch Hyperalgesie und Allodynie auslösen (GRUBB, 2010).

Bei der Therapie sollten überdies auch die physische und emotionale Situation der Patienten berücksichtigt und verbessert (FREYNHAGEN & BENNETT, 2009) und in eine umfassende Therapie integriert werden (DWORKIN et al., 2003).

## 1.5 Fragestellung der vorliegenden Untersuchungen

In der vorangegangenen zitierten Literaturübersicht zeigt sich, dass die Entstehungsmechanismen inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen eng miteinander verknüpft, aber auch noch unzureichend verstanden sind. Da der Erfolg einer Schmerztherapie essentiell für die Lebensqualität des Patienten ist, ist es notwendig, sie besonders effektiv durchführen zu können. Die Therapie insbesondere neuropathischer Schmerzen gelingt jedoch häufig nur unzureichend. Das Verständnis der Entstehungsmechanismen neuropathischer Schmerzen ist die Basis, um Ansatzpunkte für neue, effektivere Therapieansätze zu finden. Kation-Chlorid-Cotransporter sind Proteine, die eng mit der Entstehung von Schmerzen verknüpft zu sein scheinen. Es ist daher das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Zusammenhang der Expression der Kation-Chlorid-Cotransporter NKCC1 und KCC2 sowie ihrer möglichen Regulatoren CIP1 und WNK3 mit der Entstehung inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen zu untersuchen. Die Bildung von Proteinen im Organismus erfolgt in mehreren Schritten. D. h., es kann über mehrere Teilprozesse regulativ in die Proteinbiosynthese eingegriffen werden. Die vorliegende Arbeit analysiert die proteinogenen Zielgene auf zwei verschiedenen Ebenen: Die Expressionslevel der Zielgene wurden sowohl auf der Ebene der Transkription, durch Untersuchung der Expression der *messenger* Ribonukleinsäure, als auch auf der Ebene der Translation, durch Untersuchung des entstandenen Proteins, untersucht.

Bisher wurden die beiden Kation-Chlorid-Cotransporter NKCC1 und KCC2, meist aber nur KCC2, lediglich zu vereinzelten Zeitpunkten pathologischer Schmerzen untersucht. Simultane Untersuchungen von NKCC1 und KCC2 im zeitlichen Verlauf inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen liegen bisher nicht vor, könnten jedoch auf Grund ihrer Funktion als Gegenspieler wertvolle Erkenntnisse liefern. Für die vorliegende Arbeit wurde die Expression von NKCC1 und KCC2 1 h, 4 h, 1 d, 2 d und 12 d nach der Intervention erfasst. Durch die parallele Expressionsanalyse der Zielgene im Zeitverlauf wurde die Möglichkeit geschaffen, Veränderungen zu verschiedenen Zeitpunkten und in verschiedenen Synthesestufen bei der Chronifizierung von inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen zu entdecken. In den für diese Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen wurde die Frühphase der Entstehung pathologischer Schmerzen in den ersten zwei Tagen

nach Intervention sowie nach zwölf Tagen auf Expressionsveränderungen der Zielgene untersucht.

Um die Untersuchung der Proteine NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 zu ermöglichen, wurden inflammatorische Schmerzen mittels der Injektion von *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) oder neuropathische Schmerzen mittels *Chronic Constriction Injury* (CCI) –Operation bei insgesamt 164 Ratten induziert und die dadurch ausgelösten Veränderungen der Schmerzempfindlichkeit durch Verhaltensuntersuchungen mittels des *von Frey-Filament* und mittels des Plantar Test quantifiziert. Zur Analyse der zu untersuchenden Proteine mittels Western Blot und *real-time* quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (rtqPCR) wurden den Versuchstieren lumbales Rückenmark auf Höhe der Austrittsstelle des *N. ischiadicus* sowie lumbale Spinalganglien (L4-L6) ipsilateral zum Eingriff (linke Seite) entnommen. Die Gewebeentnahme fand 1 h, 4 h, 1 d, 2 d und 12 d nach der Intervention statt, um die möglichen Expressionsveränderungen der Zielgene nach ihrer Transkription durch Untersuchung der *messenger* Ribonukleinsäure und nach ihrer Translation durch Untersuchung des entstandenen Proteins im zeitlichen Verlauf zu erfassen.

Folgende Fragen sollten dabei geklärt werden:

- Verändert sich die Expression der beiden Kation-Chlorid-Cotransporter NKCC1 und KCC2 im lumbalen Rückenmark und in den lumbalen Spinalganglien (L4-L6) im zeitlichen Verlauf bei inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen?
- Verändert sich die Expression von CIP1 und WNK3, als mögliche Regulatoren von NKCC1 und KCC2, im lumbalen Rückenmark und in den lumbalen Spinalganglien (L4-L6) im zeitlichen Verlauf bei inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (AZ 87-51.04.2010.A358) wurden die tierexperimentellen Untersuchungen in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 164 männliche Wistar Ratten verwendet. Die Tiere stammten teils aus der hauseigenen Zucht der Tierversuchsanlage Düsseldorf oder wurden von der Firma Janvier (Saint Berthevin Cedex, Frankreich) bezogen. Die Tiere aus der hausinternen Zucht wurden in Makrolon® Einzelkäfigen Typ drei (800 cm<sup>2</sup>, Höhe 18,5 cm) auf Einstreu aus entkeimtem Weichholzgranulat (Rettenmaier & Söhne GmbH und CoKG, Rosenberg, Deutschland) gehalten. Die von extern bezogenen Tiere wurden nach ihrer Anlieferung sofort auf die gleichen Käfige umgestellt. Der Wechsel der Einstreu fand einmal wöchentlich statt. Zur Trinkwasserversorgung *ad libitum* wurde ozonisiertes und mit Salzsäure angesäuertes Wasser (pH 2,6-3) verwendet. Ein Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) stand *ad libitum* zur Verfügung. Die klimatisierte Haltung fand bei 22°±2° C und einer relativen Luftfeuchte von 50±5 % mit einer Luftumwälzrate von 16-20 Mal pro Stunde statt. Das Lichtprogramm bestand aus weißem Kunstlicht bei 300-320 lx im zwölf Stunden Rhythmus.

Zu Beginn der Untersuchungen hatten die ca. sechs Wochen alten Tiere ein Gewicht von 300-350 g. Die Adaptationsphase vor Versuchsbeginn betrug für die hausintern gezüchteten Tiere 24 Stunden sowie für die von extern bezogenen eine Woche. Vor Durchführung der Untersuchungen wurde durch eine tierärztliche Allgemeinuntersuchung sichergestellt, dass die verwendeten Tiere klinisch unauffällig waren.

## Material und Methoden

Um vergleichende Untersuchungen inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen durchführen zu können, wurden für jede Versuchsgruppe Untersuchungen im „inflammatorischen“ sowie „neuropathischen Schmerzmodell“ vorgenommen. Die Aufteilung der Versuchstiere in behandelte Tiere und Sham-Tiere erfolgte randomisiert (Tab. 3). Alle Verhaltensuntersuchungen wurden verblindet von denselben Personen durchgeführt.

**Tab. 3: Darstellung der verwendeten Tierzahl in den vier Versuchsgruppen**

Versuchsdauer	CFA-Behandlung		CCI-Behandlung	
	Sham	CFA	Sham	CCI
<b>1 h</b>	6	6	6	7
<b>4 h</b>	6	8	6	6
<b>1 d</b>	6	6	6	6
<b>2 d</b>	9	9	9	9
<b>12 d</b>	13	13	13	14
Sham <sub>CFA</sub> = 40		CFA = 42	Sham <sub>CCI</sub> = 40	CCI = 42

Von den insgesamt 164 behandelten Tieren waren bei CCI-Behandlung drei Tierverluste während der Induktion der Narkose zu verzeichnen: Verlust von zwei CCI-Tieren der 12 d Versuchsgruppe und Verlust von einem Sham-Tier der 12 d CCI-Versuchsgruppe. Sham = Scheinbehandlung; CFA = *Complete Freund's Adjuvant*; CCI = *Chronic Constriction Injury*.

## 2.2 Operative Maßnahmen

### 2.2.1 Auslösung inflammatorischer Schmerzen mittels einer Injektion von *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) („inflammatorisches Schmerzmodell“)

#### 2.2.1.1 Vor- und Nachbereitung des Eingriffes

Zunächst erfolgten eine tierärztliche Allgemeinuntersuchung und das Wiegen der Tiere. Anschließend wurden die Tiere für eine kurze Allgemeinanästhesie unter eine mit Isofluran (Actavis, München-Riem, Deutschland) beschickte Glasglocke bis zum Eintreten der Bewusstlosigkeit gesetzt. Die *Planta pedis* der linken Hintergliedmaße wurde mit einem Hautantiseptikum (Kodan® Tinktur farblos, Schülke, Norderstedt, Deutschland) für die folgende Injektion desinfiziert.

Vier Stunden und 24 Stunden nach der CFA-Injektion wurden die Tiere anhand eines *Pain-Score* (Tab. 14) untersucht. Als Abbruchkriterien galten eine Abnahme des Körpergewichtes während der Versuchsdauer um mehr als 20 %, Automutilation, eine vollständige Lähmung der behandelten Extremität, ein vollständiges nicht Belasten der Extremität sowie postoperative Wundheilungsstörungen. Letztere traten während der Versuchsdurchführung jedoch nicht ein.

#### 2.2.1.2 Durchführung der *Complete Freund's Adjuvant* Injektion

*Complete Freund's Adjuvant* (CFA; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) ist eine Suspension, die nach ihrer Injektion eine Entzündungsreaktion hervorruft. Die Immunantwort wird dabei durch hitzeinaktiviertes *Mycobacterium tuberculosis* (1 mg/ml) hervorgerufen.

Den narkotisierten (siehe oben) Tiere wurden mittels einer Hamilton-Microliter®-Spritze (Hamilton Company, Reno, Nevada, USA) 50 µl CFA subkutan in die *Planta*



*pedis* der linken Hinterpfote injiziert (REN & DUBNER, 1999). Die Injektionsstelle entsprach dabei der untersuchten Teststelle (Abb. 4).

Als Kontrollen dienten Tiere, die einer Sham-Behandlung unterzogen wurden. Hierbei erfolgte die Vor- und Nachbereitung analog zu den mit CFA behandelten Tieren. Den Sham-Tieren wurden jeweils 50 µl isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) statt CFA subkutan in die linke Hinterpfote injiziert.

### **2.2.2 Auslösung neuropathischer Schmerzen mittels *Chronic Constriction Injury* (CCI) („neuropathisches Schmerzmodell“)**

#### **2.2.2.1 Vor- und Nachbereitung des Eingriffes**

Vor Beginn des Eingriffs wurden die Tiere einer tierärztlichen Allgemeinuntersuchung unterzogen und gewogen. Die Narkose wurde durch die intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg Pentobarbital (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) eingeleitet. Nach Narkoseeintritt wurde der linke Oberschenkel zwischen Hüfthöcker und Knie zunächst rasiert und anschließend mit einem Hautantiseptikum desinfiziert (Kodan® Tinktur farblos, Schülke, Norderstedt, Deutschland). Zum Schutz der Cornea vor dem Austrocknen wurde ein Augengel auf beiden Augen aufgetragen (Vidisic®, Bausch & Lomb, Berlin, Deutschland).

Um ein Absinken der Körpertemperatur zu verhindern, wurden die Tiere während des Eingriffes auf Wärmematten gelagert sowie während der Aufwachphase von Rotlichtlampen gewärmt.

Postoperativ wurde jedem Tier 5 ml isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) subkutan verabreicht, um den Flüssigkeitshaushalt zu stabilisieren.

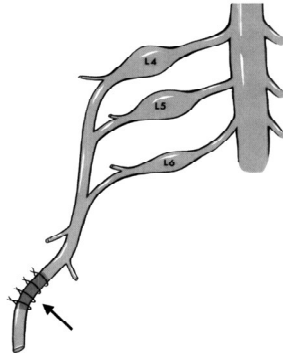
Die Untersuchung anhand des *Pain-Score* (Tab. 14) folgte vier Stunden und 24 Stunden nach der OP. Als Abbruchkriterien galten eine Abnahme des

Körpergewichtes während der Versuchsdauer um mehr als 20 %, Automutilation, eine vollständige Lähmung der behandelten Extremität, ein vollständiges nicht Belasten der Extremität sowie postoperative Wundheilungsstörungen, welche aber in der durchgeführten Untersuchung nicht auftraten.

### 2.2.2.2 Durchführung der *Chronic Constriction Injury* (CCI)

Die Behandlung *Chronic Constriction Injury* (CCI) dient der Auslösung neuropathischer Schmerzen. Die CCI wurde als Modell für eine chronische periphere Mononeuropathie entwickelt und beschrieben (BENNETT & XIE, 1988).

Dementsprechend wurde an dem narkotisierten, in rechter Seitenlage liegenden Tier im vorbereiteten Operationsfeld der linken Hintergliedmaße 5 mm caudal des *Femurs* ein 2 cm langer Hautschnitt parallel zum *Femur* angelegt. Es folgte die stumpfe Präparation durch den *Musculus biceps femoris* bis zum darunter liegenden *Nervus ischiadicus*. Nach Einlegen eines Wundspreizers wurde der *N. ischiadicus* auf einer Länge von etwa 7 mm vorsichtig von anhaftendem Gewebe befreit. Mittels chromiertem 3-0 Catgut (Lyofil, Catgut chrom, Ch.B. 010127, Vömel, Kronberg, Deutschland) wurden vier lose Ligaturen mit einem einfachen Knoten um die vorbereitete Stelle am *N. ischiadicus* im Abstand von jeweils 1 mm geschlungen (Abb. 3). Das Verengen der Ligatur erfolgte, bis lediglich eine kurze Kontraktion der linken Hinterpfote hervorgerufen wurde und die Ligatur dem Nerven locker auflag. Pathophysiologisch rufen die Fadeneigenschaften ein epineurales Ödem hervor, wodurch neuropathische Schmerzen ausgelöst werden. Anschließend erfolgten die Nähte des Muskels mittels Einzelhefte (V452 3-0, Ethicon Vicryl, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) und der Hautverschluss mit fünf Hautklammern (Leukoclip FD, Smith & Nephew, Hull, England). Der Wundbereich wurde abschließend mit 3 mg/kg Ropivacain (Naropin® 2 mg/ml Injektionslösung, Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland) intra- und subkutan lokal anästhesiert.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der CCI**

Vom Rückenmark abgehend sind die Spinalganglien L4 – L6 gezeigt. Der Pfeil verweist auf die vierfache Ligatur des *N. ischiadicus* (HOGAN, 2002).

Als Kontrollgruppe dienten Tiere, die einer Sham-Operation unterzogen wurden. Hierbei erfolgte der Zugang zum *N. ischiadicus* sowie der Wundverschluss auf dieselbe Weise wie bei den CCI-Tieren, jedoch wurde der *N. ischiadicus* nur vom umliegenden Gewebe abgehoben und es wurden keine Ligaturen angelegt (BENNETT & XIE, 1988).

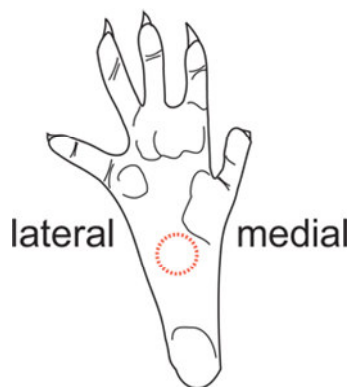
Bei dem von Bennett und Xie (1988) entwickelten Tiermodell verursacht die Nervenligatur ein immunreaktives Anschwellen des betroffenen Nerven mit nachfolgender Nervenkompression. Die Tiere entwickeln eine Hyperalgesie, die in Verhaltenstestungen messbar wird (CAMPBELL & MEYER, 2006).

## 2.3 Verhaltenstestmethoden

### 2.3.1 Allgemeine Vorgehensweise

Vor Beginn der Verhaltensuntersuchungen wurde den Tieren in ihrer neuen Umgebung eine Adaptationszeit von 15 min für Explorations- und Putzverhalten gegeben. Unruhebedingte Störungen der Messungen sollten dadurch minimiert werden.

Das auf Berührungsempfindlichkeit zu testende Hautareal befand sich auf der *Planta pedis* jeweils der rechten und linken Hintergliedmaße. Um anatomisch bedingte Unterschiede in der Berührungsempfindlichkeit auszuschließen, fanden die Messungen an einer standardisierten Teststelle statt (Abb. 4). Sowohl Ballen als auch Ferse der Hinterpfote haben eine geringere Sensibilität als die gewählte Teststelle, die vom *N. ischiadicus* innerviert wird, sodass diese Teststelle in Anlehnung an in der Literatur beschriebene Teststellen (CAMPBELL & MEYER, 2006; AUSTIN et al., 2012) zur Testung der Schmerzempfindlichkeit gewählt wurde.



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Teststelle für Berührungsempfindlichkeit an der rechten Hinterpfote (plantare Ansicht)**

(AUSTIN et al., 2012).

Die erste Messung zur Ermittlung der physiologischen Empfindlichkeit fand am Tag des Versuchsbeginns vor dem jeweiligen Eingriff statt. Die zweite Messung zur Darstellung einer veränderten Empfindlichkeit fand am Versuchsende statt (Abb. 7).

Die Verhaltenstestungen dienten der Quantifizierung der tierexperimentell induzierten chronischen Schmerzen im „inflammatorischen“ und „neuropathischen Schmerzmodell“. Bei der Entstehung von chronischem Schmerz entwickeln sich mechanische Allodynie und thermale Hyperalgesie bei den Versuchstieren, die sich durch verstärkte Verhaltensreaktionen auf mechanische und thermale Reize äußern (CAMPBELL & MEYER, 2006; AUSTIN et al., 2012). Die Verhaltenstestungen waren wichtig, um Veränderungen der Schmerzwahrnehmung der Versuchstiere im Zusammenhang mit möglichen Expressionsveränderungen der Zielgene erfassen zu können.

### **2.3.2 Testung auf mechanische Allodynie mittels des Dynamic Plantar Aesthesiometer®**

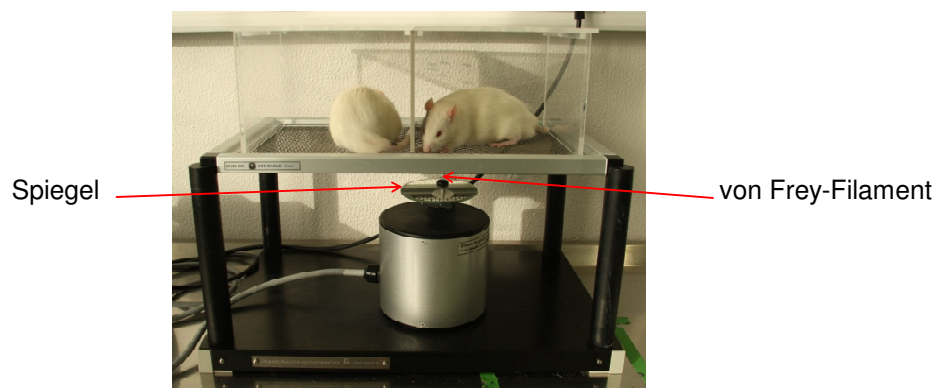
Die Entstehung von mechanischer Allodynie wurde mittels Dynamic Plantar Aesthesiometer® (Cat. No. 37400, Ugo Basile, Comerio, Italien) überprüft.

Bei dieser Messapparatur konnten jeweils an zwei Tieren alternierend Messungen durchgeführt werden. Die Tiere saßen ohne Blickkontakt in zwei getrennten Plexiglasboxen (Länge 39 cm, Höhe 14 cm, Breite 19 cm), deren Böden aus einem engmaschigen Drahtgeflecht (0,6 mm x 0,6 mm Maschenweite) bestehen. Das Aesthesiometer® (Abb. 5) wurde unter dem Drahtgeflecht positioniert, so dass über einen beweglichen Spiegel das *von Frey-Filament* (FREY, 1896) auf die standardisierte Teststelle (Abb. 4) der *Planta pedis* gerichtet werden konnte.

Bei Aktivierung des Auslösers fährt das *von Frey-Filament* ( $\varnothing$  0,5 mm) senkrecht nach oben aus, bis es die plan fußende Hinterpfote an der Teststelle berührt. Das Aesthesiometer® baut über 20 s ein Gewicht von 50 g auf, das weitere 20 s konstant gehalten wird.

Dem Kontakt zum *von Frey-Filament* konnten die Tiere zu jedem Zeitpunkt selbstständig durch ein Anheben des Fußes ausweichen und somit die Messung stoppen. Fand kein Stopp der Testung durch das Tier statt, so wurde die Messung nach insgesamt 40 s durch den Untersucher beendet.

Zur intraindividuellen Kontrolle wurden bei jedem Tier jeweils an der rechten und linken Hinterpfote mindestens vier auswertbare Testungen pro Pfote vorgenommen. Um eine Überreizung der Pfote zu verhindern, fanden die einzelnen Messungen im Abstand von 5-10 min statt. Sobald die Messung gestoppt wurde, war auf der digitalen Messanzeige jeweils die Zeit in Sekunden sowie das eingesetzte Gewicht in Gramm sichtbar und wurde vom Untersucher notiert. Diese Messwerte dienen der Quantifizierung des Pfotenrückzugsschwellenwertes (*Paw Withdrawal Threshold*, PWT), der Ausdruck der Berührungsempfindlichkeit der *Planta pedis* ist, und der Überprüfung auf die Entwicklung einer mechanischen Allodynie dient. Zeigte sich während der Testungen (Abb. 7) eine Abnahme der PWT, so sprach dies für eine erhöhte Berührungsempfindlichkeit. Ein Anstieg der PWT hingegen, zeigte eine reduzierte Berührungsempfindlichkeit.



**Abb. 5: Fotografische Darstellung des Versuchsaufbaus mit dem Dynamic Plantar Aesthesiometer® zur Testung der Entstehung einer mechanischen Allodynie**

Über einen Spiegel konnte das den mechanischen Reiz auslösende *von Frey-Filament* auf die fußsohlenseitige Teststelle ausgerichtet werden.

### 2.3.3 Testung auf thermale Hyperalgesie mittels des Plantar Test®

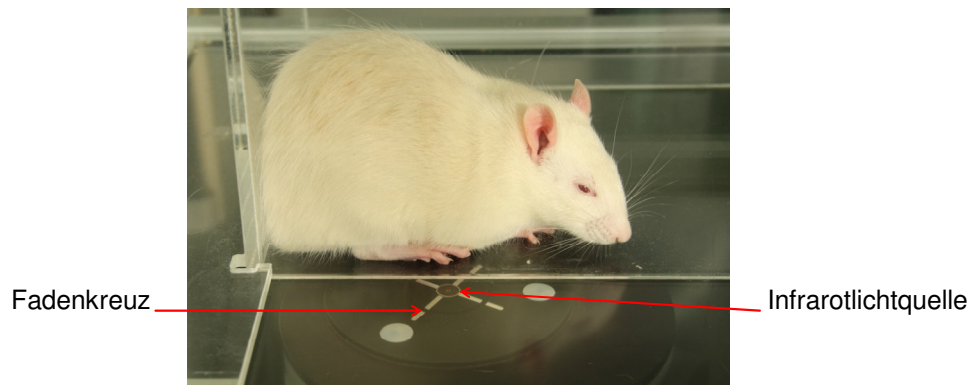
Die Entstehung von thermaler Hyperalgesie wurde mittels Plantar Test 7370® (Ugo Basile, Comerio, Italien) überprüft.

Während dieser Messungen konnten bis zu drei Tiere alternierend getestet werden (Abb. 6). Die Tiere wurden in drei nebeneinander liegende Plexiglasboxen (Länge 45 cm, Breite 17 cm, Höhe 14 cm) gesetzt. Blickkontakt zwischen den Tieren war nicht

möglich. Unter dem Plexiglasboden der Boxen befand sich eine mobile Infrarotlichtquelle. Diese konnte mit Hilfe eines Fadenkreuzes auf die standardisierte Teststelle (Abb. 4) der plan Fußenden Hinterpfote gerichtet werden (HARGREAVES et al., 1988).

Beim Aktivieren des Auslösers begann die Infrarotlichtquelle mit Intensität 40 auf die Teststelle einzuwirken. Das Tier konnte jederzeit durch ein kurzes Anheben der getesteten Pfote die Einwirkung der Infrarotlichtquelle vermeiden. Nach Beendigung jeder Messung war auf dem Display die gemessene Einwirkungszeit in 0,1 Sekundenschritten ablesbar.

Pro Tier wurden mindestens vier Messwerte zur intraindividuellen Kontrolle jeweils an der rechten und der linken Hinterpfote mittels des Plantar Test<sup>®</sup> erfasst. Die einzelnen Messungen fanden im Abstand von 5-10 min statt, um eine Überhitzung des Fußes zu vermeiden. Sofern die Tiere die Messung selbstständig beendeten, wurde der Messwert abgelesen und notiert. Fand dies nicht statt, so wurde die Messung durch den Untersucher nach 32 s beendet. Die Messwerte wurden zur Quantifizierung der Pfotenrückzugslatenz (*Paw Withdrawal Latency*, PWL) herangezogen (HARGREAVES et al., 1988), um die Entstehung thermaler Hyperalgesie darstellen zu können. Zeigte sich bei den Testungen (Abb. 7) eine, im Vergleich zu den unter physiologischen Bedingungen erhobenen Messwerten, Abnahme der PWL, so verwies dies auf eine gesteigerte Empfindlichkeit für den Wärmereiz. Eine Zunahme der PWL kennzeichnete hingegen eine reduzierte Empfindlichkeit.



**Abb. 6: Fotografische Darstellung des Versuchsaufbaus für den Plantar Test<sup>®</sup> zur Darstellung der Entstehung einer thermalen Hyperalgesie**

Hierbei konnte die den Wärmereiz auslösende Infrarotlichtquelle über ein Fadenkreuz auf die fußsohlenseitige Teststelle ausgerichtet werden.



## 2.4 Versuchsprotokoll

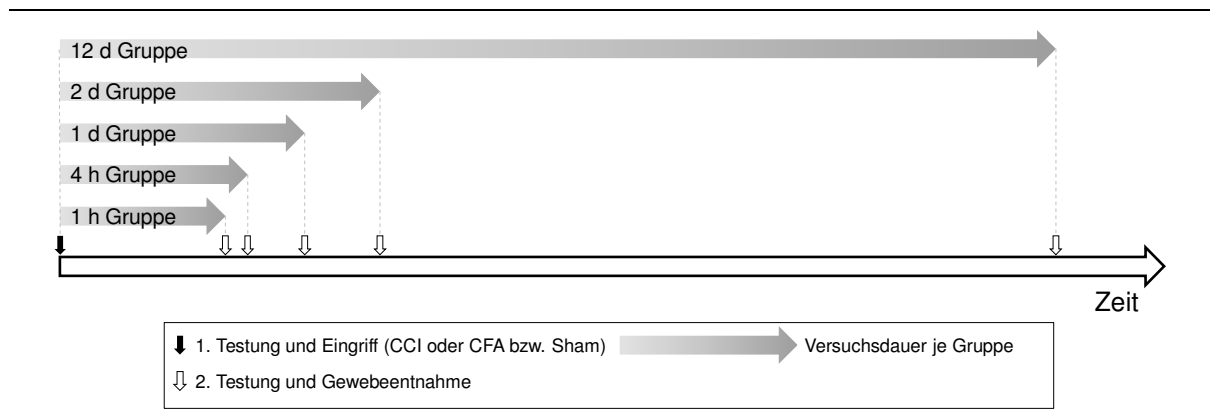
In der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf wurden sowohl die Testungen als auch die Eingriffe an den Tieren vorgenommen.

Unmittelbar vor jedem Eingriff wurde jedes Tier gewogen, tierärztlich untersucht und mittels Aesthesiometer<sup>®</sup> und Plantar Test<sup>®</sup> unter physiologischen Bedingungen untersucht. Anschließend fand die Durchführung der CFA-Injektion oder die CCI-Operation statt. Die Schmerztestung zur Darstellung der Entstehung von mechanischer Allodynie oder von thermaler Hyperalgesie mittels Aesthesiometer<sup>®</sup> oder Plantar Test<sup>®</sup> fand bei den vier Behandlungsgruppen (CCI- und Sham-Tiere sowie CFA- und Sham-Tiere) (Abb. 7) zu einem bestimmten vorgegebenen Zeitpunkt nach dem Eingriff statt. Es erfolgte erneutes Wiegen der Tiere und eine klinische Allgemeinuntersuchung. Nach Versuchsende wurden die Tiere euthanasiert (120 mg/kg Pentobarbital) und Gewebe zur molekularbiologischen Untersuchung entnommen. Die Lagerung der Tiere während der Gewebeentnahme fand auf Eis statt und wurde unverzüglich durchgeführt, um lytische Prozesse einzuschränken.

Folgende Gewebe wurden ipsilateral zum Eingriff (linke Seite) entnommen:

- Ein 1 cm langes Segment des lumbalen Rückenmarkes auf der Höhe der Austrittsstelle des *N. ischiadicus*, im weiteren Verlauf als lumbales Rückenmark bezeichnet;
- jeweils drei Spinalganglien im Bereich L4-L6.

Die Gewebe wurden unmittelbar nach ihrer Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und direkt im Anschluss bei -80 °C eingelagert. Abb. 7 verdeutlicht den zeitlichen Ablauf der Untersuchungen.

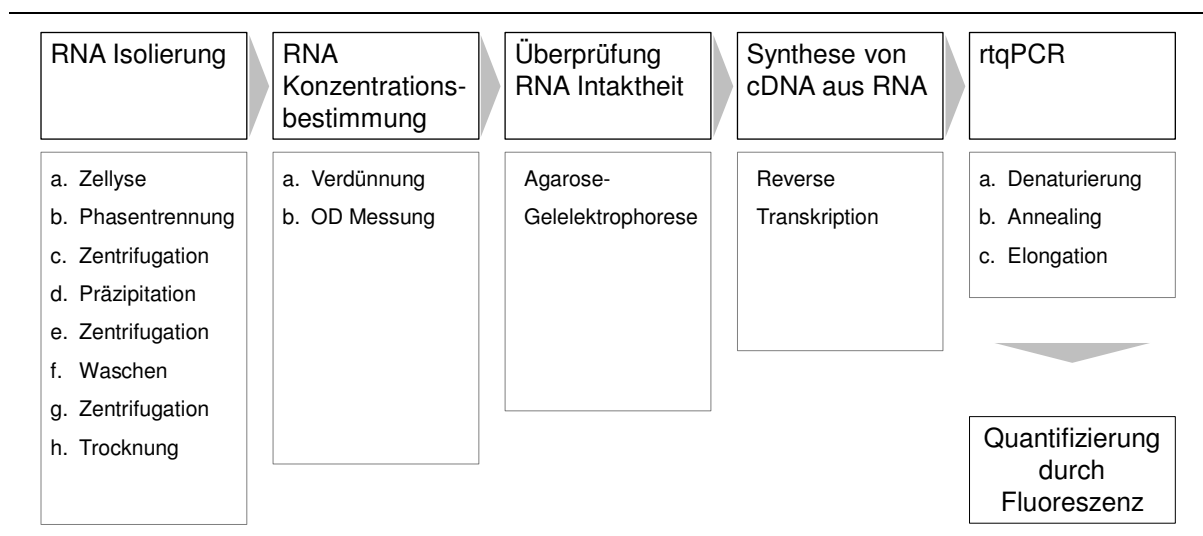


**Abb. 7: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Behandlung, der Schmerztestung und der Gewebeentnahme**

## 2.5 Molekularbiologische Untersuchungen

### 2.5.1 Analyse der mRNA-Expression spezifischer Zielgene mittels rtqPCR

Die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression der zu untersuchenden Zielgene für die Proteine NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 wurde aus den gewonnenen Rückenmark- und Spinalganglienproben mittels der *real-time* quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (rtqPCR) im vorgegebenen Zeitverlauf analysiert. Abb. 8 zeigt schematisch den Ablauf einer rtqPCR.



**Abb. 8: Schematische Darstellung der laboranalytischen Maßnahmen bis zur rtqPCR**

#### 2.5.1.1 RNA-Isolierung

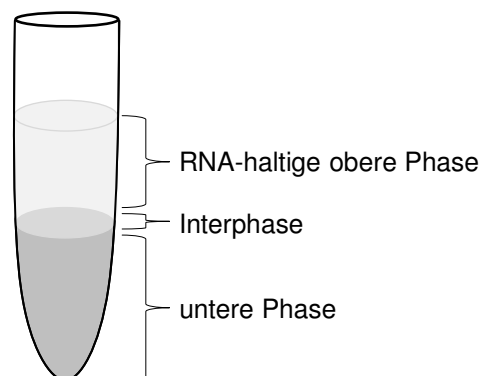
Die RNA-Isolierung beinhaltet die Lyse der zu analysierenden Zellen oder Gewebe, die Inaktivierung von RNAsen, um RNA-Abbau zu verhindern, und schließlich die eigentliche RNA-Gewinnung.

Bei den durchgeführten Untersuchungen erfolgte die RNA-Isolierung durch die *single step*-Methode mit TRIzol® Reagent (Invitrogen®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland), einer phenolhaltigen Guanidinthiocyanatlösung.

## Material und Methoden

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Gewebeproben von Rückenmark und Spinalganglien wurden kurzzeitig für den Transport in flüssigen Stickstoff überführt und jeweils mit 1 ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent homogenisiert und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform (VWR, Darmstadt, Deutschland), gründliches Schütteln und erneute Inkubation für 2-3 min mit anschließender Zentrifugation (12.000 g, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) (Zentrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland).

Guanidinthiocyanat lysiert die Zellen und inhibiert RNAsen und andere Enzyme, während sich im Phenol DNA, RNA und Proteine lösen. Chloroform verursacht während der Zentrifugation die Auftrennung in drei Phasen: Im wässrigen Überstand sammelt sich RNA, wohingegen sich in der unteren Phase Proteine und DNA akkumulieren. Beide Phasen sind durch eine Interphase getrennt (Abb. 9).



**Abb. 9: RNA-Isolierung mittels Zentrifugation**

Im Folgenden wurde die wässrige, RNA-haltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropylalkohol (Apotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf, Deutschland) versetzt, gründlich gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von Isopropanol präzipitiert die RNA. Nach anschließender Zentrifugation (12.000 g, 30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) (Zentrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), zweimaligem Waschen mit 1 ml 75 % Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und erneuter Zentrifugation (7.500 g, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet getrocknet.

### 2.5.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Mittels Absorptionsspektrometrie (NanoDrop® ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA) wurden die Menge der erhaltenen RNA erfasst sowie ihre Qualität untersucht. Hierfür wurde das RNA-Pellet gelöst. Die aus Rückenmark isolierte RNA, wurde mit 70 µl, diejenige aus Spinalganglien mit 20 µl Aqua injectabilia (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) versetzt und geschüttelt.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (Abb. 10).

---

$$c = \left[ \frac{\mu g}{ml} \right] = OD_{260} \times V \times F$$

*c* = Konzentration der Ausgangslösung  
*F* = Multiplikationsfaktor für RNA = 40  
*OD<sub>260</sub>* = Absorption bei 260 nm  
*V* = Verdünnungsfaktor

---

**Abb. 10: Formel zur Berechnung der RNA-Konzentration nach Absorptionsspektrometrie**  
(MÜLHARDT, 2008)

Die Bestimmung des Reinheitsgrades wird aus dem Verhältnis der OD<sub>260nm</sub> zur OD<sub>280nm</sub> überprüft, da bei 280 nm das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt. RNA-Lösungen ohne proteinhaltige Verunreinigungen haben einen Quotienten von 1,8-2,0.

### 2.5.1.3 Überprüfung der RNA-Intaktheit

Die Überprüfung der isolierten RNA auf ihre Intaktheit wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Das Gel bestand aus 1,8 g Agarose (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 15 ml 10x Formaldehyd Puffer (Tab. 4) und 135 ml 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser (Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die Bestandteile wurden gemischt und für 3 min aufgekocht. Um die RNA darstellen zu können wurden anschließend 3 µl einer 13

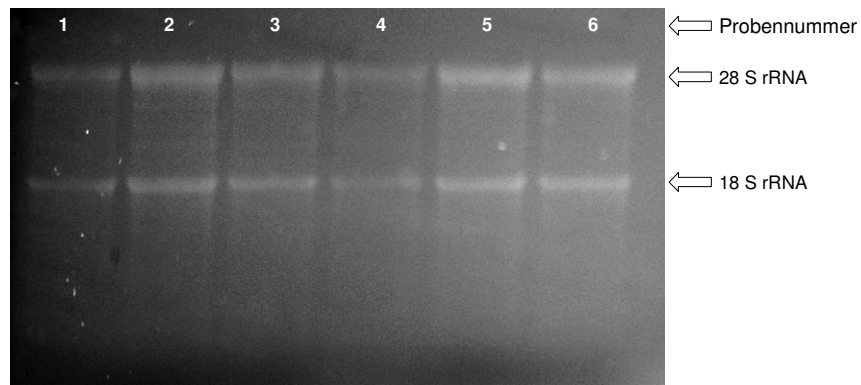
## Material und Methoden

mM Ethidiumbromidlösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und 2,7 ml 37 % Formaldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hinzugefügt. Von den zu überprüfenden RNA-Proben wurden 2,5 µg in 15 µl Gesamtvolumen RNase-freiem Wasser angesetzt und mit 3 µl Loading Buffer (Tab. 4) versetzt. Anschließend wurden die RNA-Proben für 10 min auf 70 °C im Thermocycler (C1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) erhitzt. Das Gel für die Elektrophorese wurde mit 17,5 µl der vorbereiteten RNA-Proben beladen. Nach Auffüllen der Elektrophoresekammer mit 1x Formaldehyd Puffer wurde eine Spannung von 100 V für 1 h angelegt.

**Tab. 4: Lösungen und Puffer zur Herstellung eines Gels zur Überprüfung der RNA-Intaktheit**

<b>Lösung/ Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
10x Formaldehyd Gel Buffer (pH 7)	200 mM 3-MOPS (free acid, MG 209,26) 50 mM Sodium Acetat (MG 82,03) 10 mM EDTA (MG 292,2) In 1000 ml DEPC-Wasser
1x Formaldehyd Gel Running Buffer	100 ml 10x Formaldehyd Gel Buffer 20 ml 37 % Formaldehyd 880 ml DEPC-Wasser
Loading Buffer	0,75 ml Formamid 0,15 ml 10 x Formaldehyd Puffer 0,24 ml Formaldehyd 0,1 ml H <sub>2</sub> O 0,1 ml Glycerol 0,06 ml 1 % Bromphenolblau

Ethidiumbromid fluoresziert nach Bindung an RNA und diese wird somit detektierbar. Die intakte RNA zeigt sich unter UV-Licht in Form von zwei Banden: Die 28S- und die 18S- ribosomalen RNA leuchten dabei im Verhältnis 2:1 (Abb. 11). Bei Degradierung der RNA zeigt diese eine reduzierte Fluoreszenz und das 2:1 Verhältnis der 28S- und 18S- ribosomalen RNA geht verloren.



**Abb. 11:** Beispiel einer Überprüfung der RNA-Intaktheit von sechs Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese und den dabei auftretenden typischen zwei Banden

### 2.5.1.4 Umschreibung von RNA in cDNA

Um die isolierte RNA mittels rtqPCR untersuchen zu können, ist die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA) notwendig.

Für die *two-step* rtqPCR wurde zunächst 1 µg RNA in 16 µl RNase-freiem Wasser verdünnt, mit 4 µl *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA) (Tab. 5) gemischt und wenige Sekunden zentrifugiert (Rotina 420R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland).

**Tab. 5:** Zusammensetzung des *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix*

(nach Herstellerangaben)

Reverse Transkriptase	Oligo(dT) Primer und Stabilisatoren
Rekombinantes RNase Inhibitor Protein	Buffer
Desoxyribonukleotid Triphosphate (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	MgCl <sub>2</sub>
<i>Random Primer</i>	Stabilisatoren

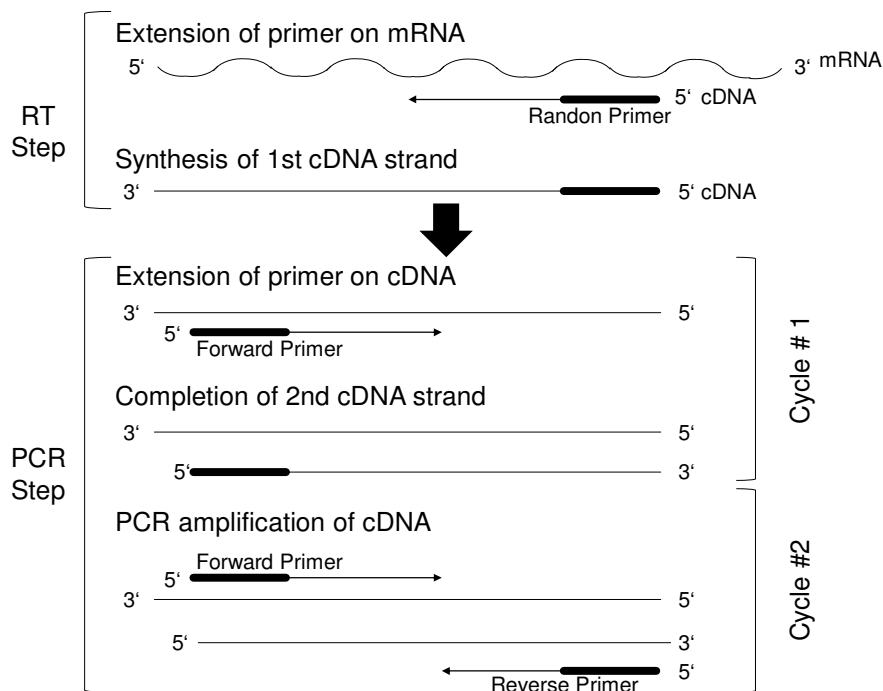
Die Synthese von cDNA aus RNA erfolgte unter folgenden Reaktionsbedingungen (Tab. 6) im Thermocycler.

**Tab. 6: Reaktionsbedingungen zur Umschreibung von RNA in cDNA**

(nach Herstellerangaben)

Temperatur	Zeit
25 °C	5 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min
12 °C	∞

Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgt durch die Reverse Transkriptase. Mit Hilfe von *Random Primern* synthetisiert die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, aus einzelsträngiger RNA doppelsträngige komplementäre DNA in 3'- nach 5'-Richtung. Mit einem Aliquot des dabei entstehenden *Template* kann anschließend der zweite Schritt der *two-step* rtqPCR durchgeführt werden (Abb. 12).



**Abb. 12: Ablauf der *two-step* rtqPCR**

Im ersten Schritt erfolgt in der reversen Transkription die Synthese von cDNA aus mRNA mit Hilfe von *Random Primern*. In den folgenden Zyklen wird die cDNA vervielfältigt. ([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms\\_039284.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_039284.pdf), 19. August 2013, 16:52)



### 2.5.1.5 Durchführung der rtqPCR

Die *real-time* quantitative Polymerase-Kettenreaktion (rtqPCR) dient der Quantifizierung von mRNA. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurden mittels rtqPCR die relativen Expressionsniveaus von NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 analysiert und quantifiziert. Als *Housekeeper* wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

Zur Durchführung der rtqPCR wurden *TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay* (Tab. 7) und *TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA) (Tab. 9) im Verhältnis 1:10 vermischt und im Doppelansatz jeweils 11  $\mu$ l pro Well (*96 Well Multiply<sup>®</sup> - PCR Plate, half skirt, natural*, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert. Für die verschiedenen Zielgene wurden folgende Assays (Tab. 7) verwendet:

**Tab. 7: Verwendete *TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays* für die mRNA-Analyse mit rtqPCR**

(Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA)

<b><i>TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay</i></b>	<b>Assay Identitätsnummer</b>
CIP1	Rn00592965_m1
KCC2	Rn00592624_m1
NKCC1	Rn00582505_m1
WNK3	Rn01409051_m1
$\beta$ -Aktin	Rn00667869_m1

Zu diesem Ansatz wurden jeweils 9  $\mu$ l verdünnte DNA addiert (Tab. 8). Als Negativkontrolle wurde für jedes Assay ein DNA-freier Ansatz ebenfalls im Doppelwert erstellt. Die rtqPCR-Zyklen (Tab. 9), Fluoreszenzdetektion und Umsetzung in eine anwendungsbezogene Software wurde mittels 7300 Real Time PCR System (Version 1.4, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) durchgeführt.

**Tab. 8: DNA-Verdünnung mit RNase-freiem Wasser**

Zielgen	Rückenmark	Spinalganglion
NKCC1	1:100	1:100
KCC2	1:10	1:10
CIP1	1:10	1:10
WNK3	1:10	1:10
β-Aktin	1:100	1:10

**Tab. 9: rtqPCR-Protokoll für NKCC1, KCC2, CIP1, WNK3 und β-Aktin**

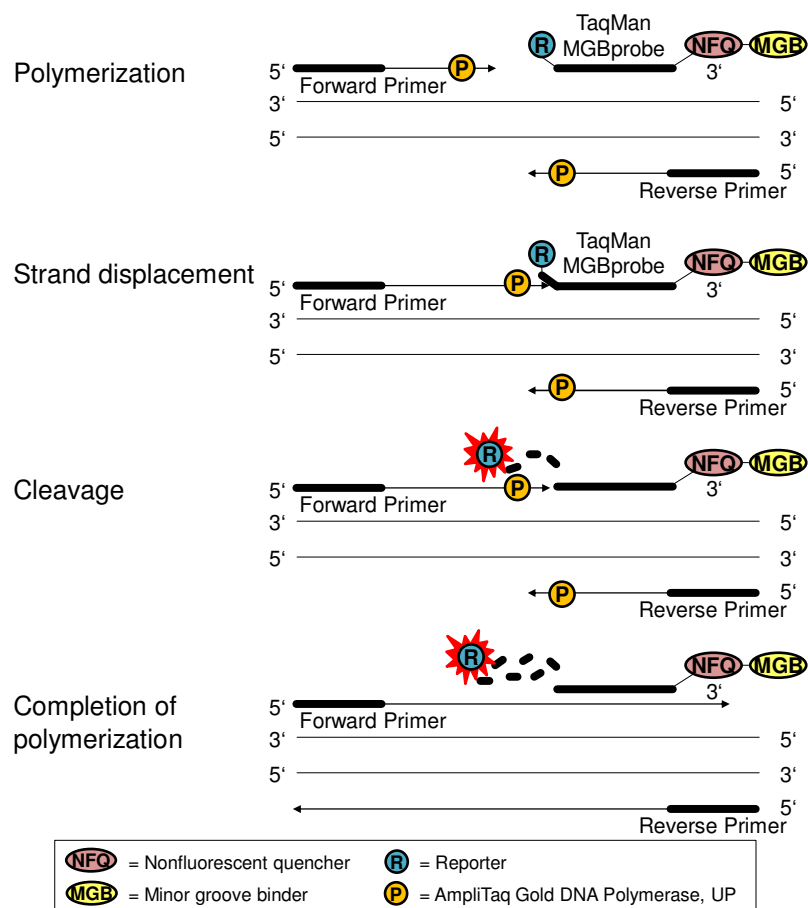
(modifiziert nach Herstellerangaben)

1.Schritt	2.Schritt	3. Schritt	
Uracil-DNA Glycosylase (UDG) Inkubation	AmpliTa <sup>®</sup> Gold DNA Polymerase, Ultra Pure (UP), Aktivierung	rtqPCR 40 Zyklen	
50 °C 2 min	95 °C 10 min	Denaturierung 95 °C 15 s	Annealing Elongation 60 °C 1 min

Das Prinzip der *real-time* quantitativen Polymerase-Kettenreaktion beruht auf der Vervielfältigung von DNA und ermöglicht die Quantifizierung der Zielgene in Echtzeit.

*TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix* beinhaltet verschiedene Komponenten, um eine sichere rtqPCR zu ermöglichen (Tab. 9). Zunächst erfolgt im ersten Schritt die Inkubation des Ansatzes in Uracil-DNA Glycosylase (UDG), um *carry-over* Kontaminationen vorheriger Untersuchungen zu verhindern. AmpliTa<sup>®</sup> Gold DNA Polymerase, *Ultra Pure* (UP), eine speziell aufbereitete DNA-Polymerase, benötigt im zweiten Schritt eine Aktivierung bei 95 °C, damit die Polymerase erst bei vollständig denaturierter DNA synthetisiert. Diese zehnminütige Aktivierungsphase beendet auch die UDG-Aktivität. Die eigentlichen rtqPCR-Zyklen beginnen im dritten Schritt mit der Denaturierung der zu untersuchenden DNA-Proben. Während dieser kurzen Zeitspanne trennen sich durch die hohen Temperaturen bedingt die beiden DNA-Stränge und liegen anschließend als Einzelstränge vor. Für das folgende Annealing erfolgt nun eine Temperaturabsenkung, durch die Primer und Ziel-DNA hybridisieren. Die Elongation des Primers und somit Synthese doppelsträngiger DNA erfolgt nun

durch die DNA-Polymerase. Zahlreiche Wiederholungen dieses Zyklus führen zur Vervielfältigung der DNA. Die Quantifizierung der Zielgene in der rtqPCR wird durch Fluoreszenzdetektion ermöglicht, die auf der Funktion des, je nach seinem Zielgen ausgerichteten, *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression* Assay beruht. Das *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression* Assay besteht aus einer *TaqMan*<sup>®</sup> *Minor Groove Binder* (MGB) Sonde und Primer. Die Sonde enthält einen Reporterfarbstoff am 5'- Ende sowie einen nicht fluoreszierenden Quencher am 3'- Ende. Die Sonde wird während der rtqPCR durch die DNA Polymerase gespalten, wodurch der Reporterfarbstoff freigesetzt wird. Durch die Abspaltung bedingt, wird die Fluoreszenz des Reporters erhöht und gemessen (Abb. 13).



**Abb. 13: Schematische Darstellung der Abspaltung des fluoreszierenden Reporterfarbstoffes**

Die Quantifizierung der Zielgene in der rtqPCR erfolgt mittels Fluoreszenzdetektion. Die *Minor Groove Binder* (MGB) Sonde besitzt am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff sowie am 3'-Ende einen nicht fluoreszierenden Quencher. Während der rtqPCR wird die Sonde durch die DNA Polymerase gespalten und der Reporterfarbstoff freigesetzt. Durch diese Abspaltung erhöht sich die Fluoreszenz des Reporters, die zur Quantifizierung gemessen wird. ([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms\\_039284.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_039284.pdf), 19. August 2013, 16:52)

### 2.5.1.6 Auswertung der rtqPCR

Mit Hilfe einer Software wird bei der rtqPCR der jeweilige *Cycle Threshold* (CT)-Wert der untersuchten Proben dokumentiert. Der CT-Wert beschreibt die Zykluszahl, die benötigt wird um eine definierte, konstante Fluoreszenz zu erreichen. Um die relativen Expressionsniveaus der Zielgene zu bestimmen, wurden diese auf den *Housekeeper*  $\beta$ -Aktin normiert. Mittels der  $\Delta\Delta CT$ -Methode wurden die Unterschiede der Expressionsniveaus, Ratio, berechnet (Abb. 14).

---


$$\Delta CT_{\text{Zielgen jeder Probe}} - CT_{\text{Housekeeper}} = \Delta CT$$

$$\Delta CT_{\text{CCI- bzw. CFA-Probe}} - \Delta CT_{\text{Sham-Probe}} = \Delta\Delta CT$$

$$2^{-\Delta\Delta CT} = \text{Ratio}$$

$\Delta CT$  = PCR Zykluszahl zum Erreichen eines definierten Fluoreszenzniveaus  
 Ratio = Expressionsunterschied

---

**Abb. 14: Auswertung der rtqPCR mittels der  $\Delta\Delta CT$ -Methode**

(PFAFFL, 2001; PFAFFL, 2004)

Die Auswertung der relativen Expressionsniveaus der gesamten Gruppen wurde mittels des REST-Programms (*Relative Expression Software Tool*, 2009, V.2.0.13) durchgeführt (Abb. 15).

---


$$\frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CT_{\text{Zielgen}}(MW_{\text{Sham}} - MW_{\text{CCI bzw. CFA}})}}{(E_{\text{Housekeeper}})^{\Delta CT_{\text{Housekeeper}}(MW_{\text{Sham}} - MW_{\text{CCI bzw. CFA}})}} = R$$

$R$  = mittlere Expressionsunterschiede der Gruppen  
 $E$  = Expressionsunterschied

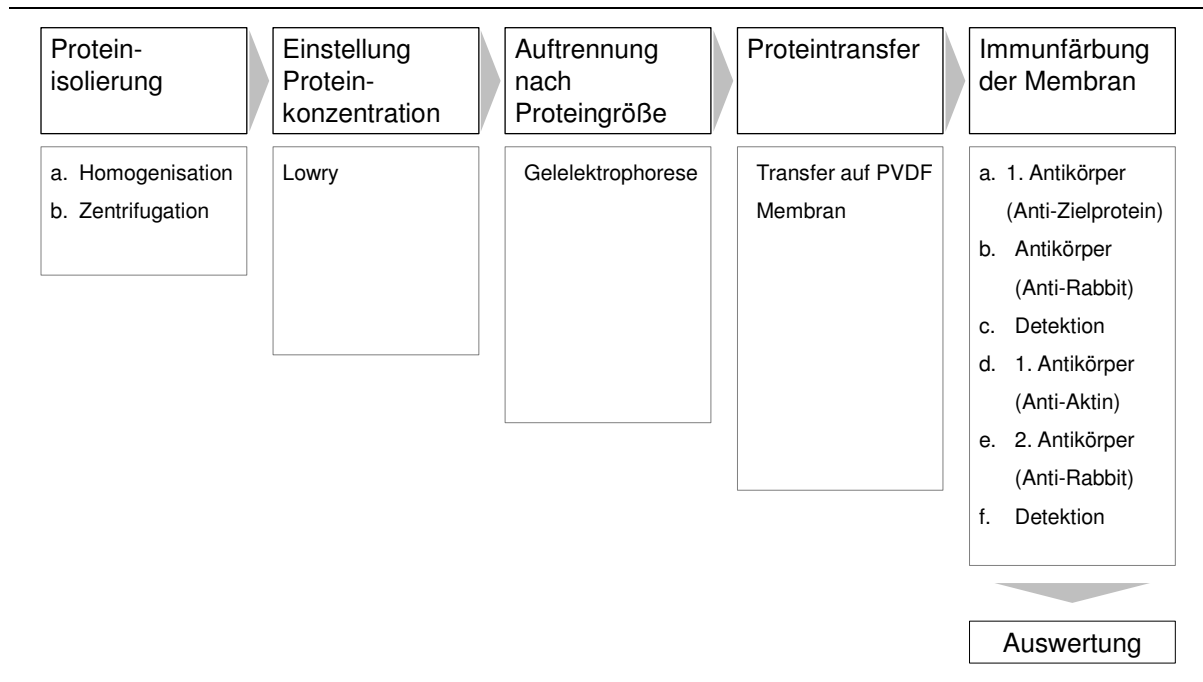
---

**Abb. 15: Auswertung der relativen Expressionsniveaus mittels REST**

(PFAFFL et al., 2002; PFAFFL, 2004)

### 2.5.2 Proteinanalyse mittels Western Blot

Die Untersuchung der Expression von NKCC1 und KCC2 Protein in Rückenmarksgewebe erfolgte am Tag 2 und am Tag 12 mittels Western Blot Analyse (Abb. 16).



**Abb. 16: Schematische Darstellung der Abfolge der laboranalytischen Teilschritte der Western Blot Analyse**

## 2.5.2.1 Probenaufbereitung

Die bei -80 °C tiefgefrorenen und gelagerten Gewebeproben wurden in flüssigen Stickstoff überführt und gewogen, mit eiskaltem Lysepuffer (Tab. 11) und einem Proteaseinhibitor (Complete, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) versetzt und homogenisiert (Dispergierstation T.8.10, Ultra-Turrax T8, IKA®-Werke, Staufen, Deutschland). Pro 100 mg Gewebe wurde 1 ml Lysepuffer hinzugefügt. Pro 1 ml Lysepuffer wurden außerdem 40 µl einer 25-fachen Complete Stocklösung addiert. Das Homogenisat wurde in einer Mikrozentrifuge (Zentrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert (4 °C, 1000 g, 15 min), um Protein und Zelldebris zu trennen. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

## 2.5.2.2 Quantifizierung des Proteingehaltes

Die Quantifizierung des Proteingehaltes in den einzelnen Proben erfolgte nach Lowry (LOWRY et al., 1951).

Die Proben wurden 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend 500 µl Lowry Reagenz (Tab. 11) pro Probe addiert, das Gemisch geschüttelt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 50 µl von 1:1 mit destilliertem Wasser verdünntem Folins Reagenz (Tab. 11) hinzugefügt, erneut gründlich gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit erfolgt ein Farbumschlag durch Komplexbildung des Proteins und des im Lowry Reagenz enthaltenen Kupfers (Biuret Reaktion) mit anschließender blauer Komplexbildung aus frei gewordenen Kupferionen und dem Folins Reagenz (GORNALL et al., 1949). Durch Doppelbestimmung (Microtestplatte 96 Well, Flat Bottom, Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) wurde die Proteinkonzentration von je 200 µl des Probengemisches gemessen. Die Blaufärbung diente als Maß für die Proteinkonzentration, die unverzüglich im Photometer (Synenergy 2, BioTek®, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Extinktion von 750 nm gemessen wurde. Die Ermittlung der Proteinkonzentration fand mittels einer entsprechenden Software (Gen 5™, BioTek®, Bad Friedrichshall, Deutschland) unter Bezugnahme auf eine parallel gemessene Eichreihe (0-100 µg/µl bovines Serumalbumin) statt. Somit konnten anschließend die Proben mit dem Lysepuffer auf einheitliche Proteinkonzentrationen eingestellt werden.

### **2.5.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Um die zu untersuchenden Proteine darstellen zu können, war zunächst deren Trennung nach ihrer Molekülmasse nötig. Mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gele modifiziert nach Laemmli (LAEMMLI, 1970) wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt.

Die eingestellten Proben wurden mit Loading Buffer (Tab. 11) 1:1 verdünnt und das Proben-Puffer-Gemisch für 30 min bei 37 °C erhitzt (neo-Block-Heizer Duo, 2-2504, neoLab®, Heidelberg, Deutschland).

Das im Loading Buffer enthaltene β-Mercaptoethanol reduziert Proteine durch Disulfidbrückenspaltung, anschließend bildet Natriumdodecylsulfat (SDS) mit den Proteinen einen negativ geladenen Komplex, sodass sich die im Probengemisch enthaltenen Proteine nur noch durch ihre Molekülgröße unterscheiden.

Für die Gelelektrophorese wurden Polyacrylamidgele (Tab. 10) mit einer Dicke von 1,5 mm und 6 cm Lauflänge in einer Glasplattenhalterung hergestellt. Das Polyacrylamidgel bestand aus einem 7,5 % Trenngel, auf das ein 6 % Sammelgel mit zehn Taschen aufgetragen wurde. Nach Polymerisieren der Flüssigkeiten zu einem Gel wurde eine Tasche mit einem 5 µl Molekulargewichtsmarker (Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder, Thermoscientific, Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) und die folgenden Taschen jeweils mit 50 µg des eingestellten Probenproteins beschickt. Leere Taschen wurden mit 10 µl Loading Buffer befüllt. Anschließend wurden die Gele in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, die mit 1x Running Buffer (Tab. 11) befüllt wurde, und eine Spannung von 100 V für ca. 85 min angelegt.

Der pH-Gradient zwischen dem neutralen Sammelgel und dem basischen Trenngel verursacht eine Sammlung der Proteine auf der gleichen Gelhöhe. Die elektrische Spannung bewirkt eine vertikale Wanderung der Proteine durch das Gel, wobei die Proteine nach ihrem Massengewicht aufgetrennt werden. Um das Massengewicht der Proteine bestimmen zu können, wird ein Marker eingesetzt, der Proteine definierter Größe als Referenz enthält. Das im Loading Buffer enthaltene Bromphenolblau dient als Kontrolle für die Laufgeschwindigkeit der Proteine.

Sobald der Loading Buffer das Gel fast vollständig durchwandert hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt, die Gele aus ihrer Glasplattenhalterung genommen und das Sammelgel verworfen.

**Tab. 10: Zusammensetzung der beiden für die SDS-Page erforderlichen Gele**

<b>Gel</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Trenngel 7,5 %	5 ml PAA 30 % 9,8 ml Aqua dest. 5 ml 1,5 M Sigma 7-9, pH 8,8 200 µl SDS 10 % 20 µl Temed 100 µl APS 10 %
Sammelgel 6 %	2,55 ml PAA 30 % 10,5 ml Aqua dest. 1,5 ml 1,25 M Sigma 7-9, pH 6,8 150 µl SDS 10 % 30 µl Temed 150 µl APS 10 %

#### 2.5.2.4 Proteintransfer

Nach Beendigung der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran.

Pro Gel wurden ein in Transfer Puffer (Tab. 11) getränktes Fiberpad (Bio-Rad<sup>®</sup> Hercules, Kalifornien, USA) gefolgt von drei ebenfalls in Transfer Puffer getränkten Filterpapieren (Whatman<sup>™</sup> Chromatography Paper, Grade 3 MM Chr, Kent, United Kindom) deckungsgleich in einer Gelkassette gestapelt und dazwischen liegende Luftblasen entfernt. Darauf wurde das Gel gefolgt von einer vorher für 5 min in Methanol eingelegten Membran (Immobilon-P<sup>®</sup> Transfer Membran, pore size 0,45 µm, Filter Type: PVDF, Milipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA) luftblasenfrei geschichtet. Anschließend folgten, wie oben beschrieben, wieder drei Filterpapiere und abschließend ein Fiberpad. Die geschlossene Gelkassette wurde mit der Membran anodenseitig in eine Transferkammer mit Kühlelement (Biolce Cooling Unit, Bio-Rad<sup>®</sup> Hercules, Kalifornien, USA) und Magnetührstab (HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland) eingesetzt und mit Transfer Puffer aufgefüllt. Die Transferzeit betrug 60 min bei einer Stromstärke von 220 mA.



Während der Transferzeit wandern die Proteine vom kathodenseitigen Gel auf die anodenseitige Membran, bleiben auf Grund von hydrophober und polarer Wechselwirkungen an ihrer Oberfläche haften und übertragen somit das Proteinmuster vom Gel auf die Membran.

### **2.5.2.5 Kontrolle der Gelelektrophorese mittels *Coomassie Blue***

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Elektrophorese und der Proteinintaktheit wurden die Gele nach dem Proteintransfer für 30 min in *Coomassie Blue* unter Rüttelbewegungen angefärbt und anschließend mit Leitungswasser entfärbt. Nach 60 min wurde das Leitungswasser erneuert und das Gel darin über Nacht gelagert.

Durch Anlagerung an die Seitenketten der Aminosäuren der Proteine färbt *Coomassie Blue* (Tab. 11) im Gel enthaltene Proteine unspezifisch an, sodass Proteinbanden erkennbar werden, die Zeichen einer gelungenen Elektrophorese sind.

### **2.5.2.6 Blocken und Immunfärbung der Membran**

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen für 2 h in einer 5 % Blocklösung (Tab. 11) bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Blocklösung verworfen und die Membran in einer Verdünnung aus einer 1 % Blocklösung (Tab. 11) und dem proteinspezifischen Primärantikörper (Anti-NKCC1/ -KCC2) (Tab. 12) über Nacht bei 4 °C unter Schüttelbewegungen inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte dreimaliges Waschen der Membranen für je 10 min mit kaltem TBS-T-Waschpuffer (Tab. 11) unter Schüttelbewegung. Anschließend wurde die Membran mit einem in 1 % Blocklösung 1:10.000 verdünnten markierten Sekundärantikörper (Anti-Rabbit) (Tab. 12) beschickt und für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach der Einwirkzeit wurden die Membranen erneut dreimalig mit 4 °C kaltem TBS-T-Waschpuffer für 10 min gewaschen und anschließend detektiert.

**Tab. 11: Zusammensetzung der für die Proteinanalyse verwendeten Lösungen und Puffer**

<b>Lösung/ Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
10x Running Buffer	30 g Sigma 7-9 144 g Glycin 10 g SDS ad 1 l Aqua destillata
1x Running Buffer	1 : 10 10x Running Buffer und Aqua destillata
Blocklösung 1 %	Blocklösung 5 % 1 : 5 mit TBS-T verdünnen
Blocklösung 5 %	50 g <i>dried skimmed milk</i> ad 1000 ml TBS-T
Coomassie Färbung	750 mg Coomassie Blue 25 ml Eisessig 112,5 ml Ethanol ad 112,5 ml Aqua destillata
Folins Lösung	1 : 1 Folins Reagenz und Aqua destillata
Loading Buffer	1 : 10 Mercaptoethanol und SDS-Stop-Puffer
Lowry Reagenz	10 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 500 ml 0,1 mol NaOH lösen 1 Teil 2 % Kalium-Natrium-Tartrat 1 Teil 1 % CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
Lysepuffer (pH 7,4)	250 mM Sucrose 10 mM TrisHCl 10 mM HEPES 1 mM Na-EDTA
SDS-Stop-Puffer	7 ml Aqua destillata 1 ml 500 mM TrisHCl (15,8 g Tris HCl + 200 ml Aqua destillata, pH 6,8) 2 ml Glycerol 1 g SDS 30 mg Bromphenolblau
TBS-T (pH 8,0)	6 g Sigma 7-9 22,2 g NaCl 2 ml Tween ad 2.000 ml Aqua destillata

## Material und Methoden

Transfer Puffer	1,453 g Sigma 7-9 [12 mM] 7,206 g Glycin [96 mM] ad 1.000 ml Aqua destillata
-----------------	--

**Tab. 12: Für die Proteinanalyse mittels Western Blot verwendeten Antikörper**

<b>Antikörper Bestellnummer</b>	<b>Verdünnung Hersteller</b>
Anti-Aktin (A 2066)	1 : 10.000 <i>Affinity isolated antigen specific antibody Anti-Actin</i> Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Anti-KCC2 (07-432)	1 : 1.000 <i>Purified rabbit polyclonal IgG Anti-K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup></i> <i>Cotransporter</i> Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Anti-NKCC1 (AB 3560P)	1 : 500 <i>Rabbit affinity purified polyclonal antibody Anti-</i> <i>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> Cotransporter</i> Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Anti-Rabbit (711-035-152)	1 : 10.000 <i>Peroxidase-conjugated AffiniPure donkey Anti-</i> <i>Rabbit IgG (H+L)</i> Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA

Während der Inkubation der Membran in 5 % Blocklösung sättigen die enthaltenen Milchpulverbestandteile die Proteinbindungsstellen der Membran ab. Im Folgenden bindet der hinzugegebene Primärantikörper an sein auf der Membran fixiertes Antigen. Das Waschen mit TBS-T-Waschpuffer entfernt ungebundene anti-Antigen-Antikörper. Der nun addierte Sekundärantikörper bindet an den anti-Antigen-Antikörper und ermöglicht durch seine Markierung mit Meerrettichperoxidase später die Detektion durch Chemolumineszenz. Das erneute Waschen mit TBS-T-Waschpuffer entfernt wieder ungebundene Komplexe.

Nach der ersten Detektion wurden die Membranen erneut zunächst mit einem als *Housekeeper* dienenden Primärantikörper (Anti-Aktin) (Tab. 12) und anschließend mit einem Sekundärantikörper (Anti-Rabbit) (Tab. 12), wie oben beschrieben behandelt und detektiert. Die relativen Expressionsniveaus der zu untersuchenden Proteine wurden auf Aktin als *Housekeeper* normiert, um eine Vergleichbarkeit der Bandenstärken herzustellen und zu überprüfen, ob in der Elektrophorese in jeder Tasche die gleiche Menge Protein vorhanden war.

### 2.5.2.7 Detektion der Proteinbanden

Zur Darstellung der Proteinbanden wurden die Membranen für 1 min in Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Kalifornien, USA) geschwenkt. Zur unverzüglich darauf stattfindenden Detektion der lumineszierenden Proteinbanden wurde nach Herstellerangaben eine hoch auflösende Kamera (CoolSnap HQ<sup>2</sup>, Photometrics®, Tuscon, Arizona, USA) genutzt.

Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation von Luminol im Beisein von Wasserstoffperoxid. Sowohl Luminol als auch Wasserstoffperoxid sind Bestandteile des Luminolreagents. Die dadurch hervorgerufene Chemolumineszenz wird sichtbar.

### 2.5.2.8 Auswertung der Proteinbanden spezifischen Immunoblots

Mittels einer Software (Gel-Pro Analyzer, Version 6.0.0.349, Media Cybernetics, Rockville, USA) wurden die zu untersuchenden Proteinbanden, in Relation zu ihrem jeweiligen *Housekeeper*  $\beta$ -Aktin, miteinander verglichen, um die relativen Expressionsänderungen der Proteine zu untersuchen.

## 2.6 Statistische Auswertung und graphische Datendarstellung

Die Ergebnisse der Verhaltensuntersuchungen wurden in dieser Arbeit als Mittelwerte (M) + Standardfehler (SE) der PWT und PWL berechnet und im Säulendiagramm als M + SE graphisch dargestellt. Nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung wurden die Ergebnisse der CFA- bzw. CCI-Gruppen im Vergleich mit ihrer jeweiligen Sham-Gruppe mittels des gepaarten t-Tests ausgewertet. Ein ermittelter Wert von  $p \leq 0,05$  galt als signifikant (Prism 5, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Die mRNA Analyse mittels rtqPCR erfolgte entsprechend den Herstellerangaben nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode. Nach Normierung der behandelten CFA- bzw. CCI-Gruppe auf ihre Sham-Gruppe (Sham = 1) mittels REST Software (PFAFFL, 2001; PFAFFL et al., 2002) wurde der p-Wert ermittelt. Ein p-Wert  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant betrachtet. Die Ergebnisse wurden als M + SE im Säulendiagramm graphisch dargestellt.

Die Auswertung der Western Blot Protein Analysen erfolgte, indem von den Sham-Gruppen (Sham = 1) und der jeweiligen behandelten CFA- bzw. CCI-Gruppe die M + SE ermittelt und mittels des gepaarten t-Tests analysiert wurden. Ein Wert von  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Die graphische Darstellung erfolgte in dieser Arbeit im Säulendiagramm als M + SE.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Verhaltensuntersuchungen

Für die Verhaltensuntersuchungen wurden insgesamt 164 Tiere in den Versuch genommen. Die Daten von 161 Tieren wurden ausgewertet, drei Tiere verstarben vorzeitig. Zu Beginn der Untersuchungen wurde jedes Tier unter Normalbedingungen, also vor dem CFA- bzw. CCI-Eingriff und vor dem Sham-Eingriff mittels des Aesthesiometer<sup>®</sup> und des Plantar Test<sup>®</sup> getestet („Baseline“). Zum jeweiligen vorgegebenen Versuchsende (Abb. 7) wurde jedes Tier zur Überprüfung der Entstehung mechanischer Allodynie und thermaler Hyperalgesie erneut getestet. Es wurde jeweils die rechte und linke Hinterpfote der Tiere getestet. Die vorausgegangenen Eingriffe waren nur an der linken Hintergliedmaße vorgenommen worden. Die rechte Hinterpfote diente der intraindividuellen Kontrolle.

#### 3.1.1 Ergebnisse zur Entwicklung mechanischer Allodynie

##### 3.1.1.1 Mechanische Allodynie im „inflammatorischen Schmerzmodell“

Vor dem Eingriff an der linken Hinterpfote wurde sowohl für die mit CFA zu behandelnden Tiere als auch für die Sham-Tiere die „Baseline“ erstellt. Der gepaarte t-Test der Sham-Tiere gegen CFA-Tiere ergab keinen Unterschied ( $p = 0,4579$ ). Die Verhaltenstestungen zeigten 1 h nach CFA-Injektion eine tendenzielle Reduktion des Pfotenrückzugsschwellenwertes (PWT, *Paw Withdrawal Threshold*) an der behandelten linken Hinterpfote ( $p = 0,1031$ ). Bei drei Sham-Tieren und drei CFA-behandelten Tieren war die Verhaltenstestung 1 h nach dem Eingriff durch Nachwirkungen der Anästhesie nicht möglich. 4 h nach CFA-Injektion reduzierte sich die PWT im Vergleich zu den Sham-Tieren signifikant ( $p = 0,0335$ ). 1 d nach der CFA-Injektion war die PWT der CFA-Tiere weiterhin erniedrigt, jedoch nicht mehr signifikant ( $p = 0,0950$ ). Nach 2 d verringerte sich der Unterschied zwischen Sham-

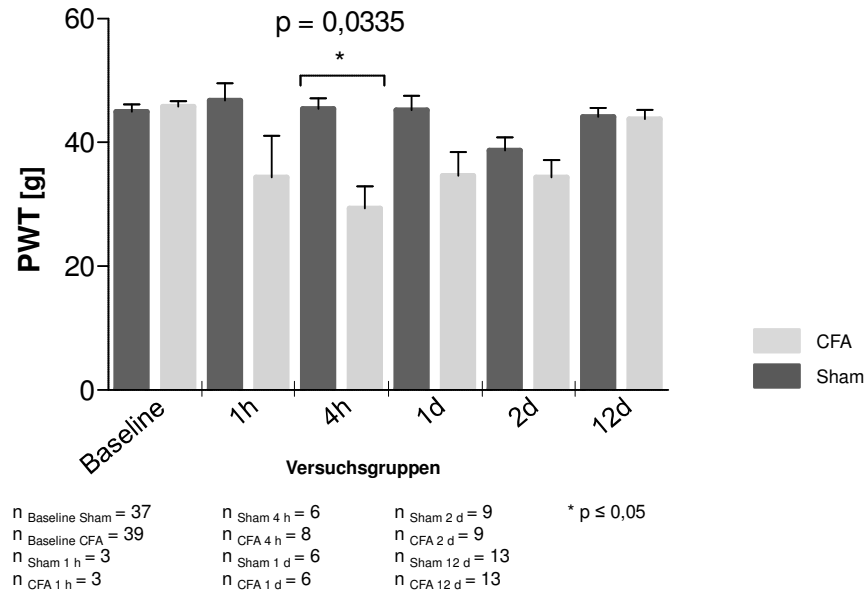
## Ergebnisse

und CFA-Tieren weiter, um nach 12 d sich wieder dem Niveau der „Baseline“ anzunähern ( $p = 0,8401$ ) (Abb. 17).

Die intraindividuelle Kontrolle der rechten unbehandelten Pfote ergab bei den CFA-behandelten Tieren im Vergleich zu den Sham-Tieren weitgehend unveränderte Pfotenrückzugsschwellenwerte. Die Verhaltensuntersuchungen ergaben als Ausgangspunkt eine vergleichbare „Baseline“ ( $p = 0,7587$ ), gefolgt von ähnlichen Ergebnissen ( $p = 0,0741$ ) 1 h nach dem Eingriff an der kontralateralen Seite. Nach 4 h war die PWT der CFA-behandelten Tiere geringgradig gegenüber der PWT der Sham-Tiere reduziert ( $p = 0,6829$ ) und nach 1 d wieder auf gleichem Niveau ( $p = 0,7981$ ). Lediglich 2 d nach CFA-Injektion zeigten die Tiere eine signifikant erhöhte PWT gegenüber ihrer Sham-Gruppe ( $p = 0,0361$ ). Anschließend glichen sich bis 12 d nach dem Eingriff die beiden Gruppen wieder aneinander an ( $p = 0,6822$ ) (Abb. 18).

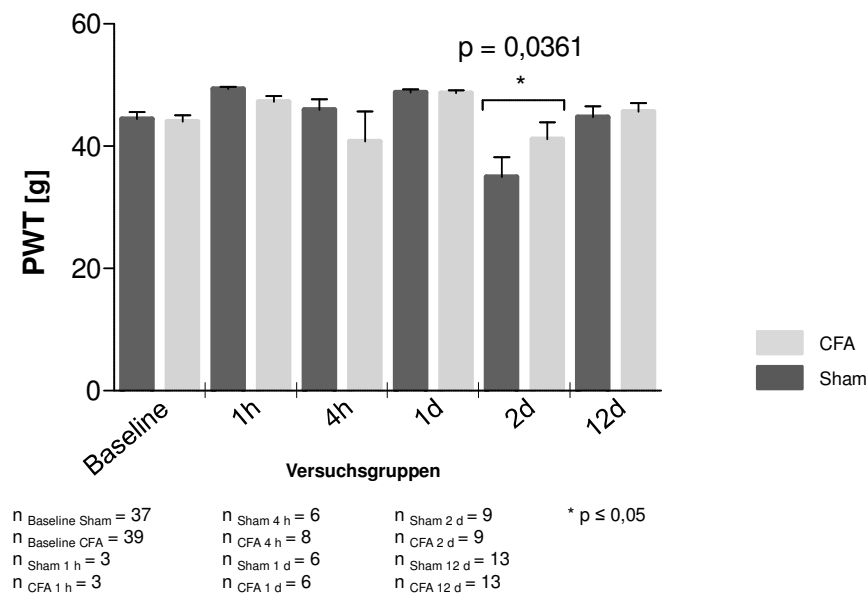
Es entwickelte sich somit an der linken behandelten Hinterpfote innerhalb von 4 h im „inflammatorischen Schmerzmodell“ eine messbare signifikante mechanische Allodynie. Der Schwellenwert der rechten, unbehandelten Pfote war zum Zeitpunkt 2 d nach dem kontralateralen Eingriff signifikant erhöht.

## Ergebnisse



**Abb. 17: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer mechanischen Allodynie an der linken CFA-behandelten Hinterpfote**

Pfotenrückzugsschwellenwert (PWT) der linken behandelten Pfote vor dem Eingriff (Baseline) sowie der verschiedenen Tiergruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt nach dem Eingriff (n = Anzahl der behandelten Versuchstiere zum jeweiligen Zeitpunkt; gepaarter t-Test Sham vs. CFA, Mittelwert + Standardfehler, \*  $p \leq 0,05$  ist signifikant).



**Abb. 18: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer mechanischer Allodynie an der rechten CFA-unbehandelten Hinterpfote**

Pfotenrückzugsschwellenwert (PWT) der rechten unbehandelten Pfote vor dem Eingriff (Baseline) sowie die verschiedenen Tiergruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt nach dem Eingriff (n = Anzahl der behandelten Versuchstiere zum jeweiligen Zeitpunkt; gepaarter t-Test Sham vs. CFA, Mittelwert + Standardfehler, \*  $p \leq 0,05$  ist signifikant).



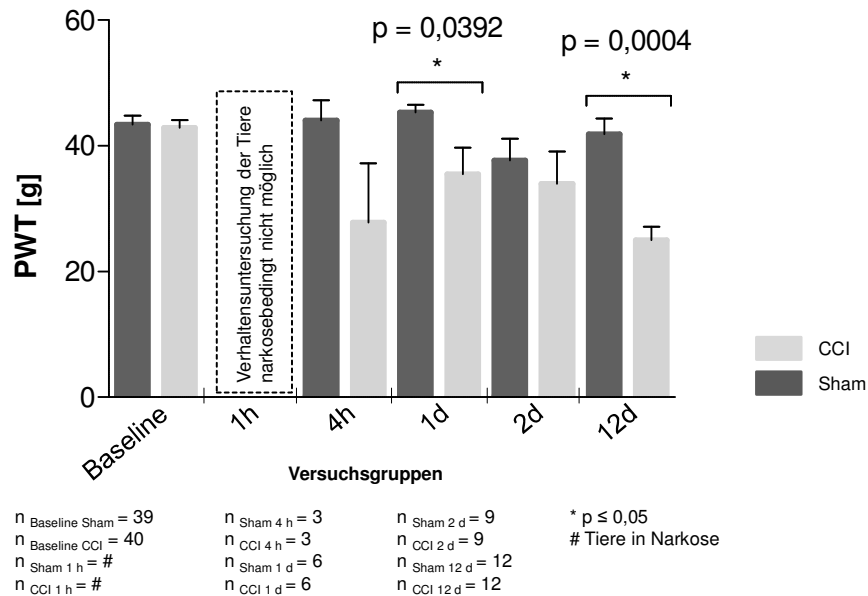
### 3.1.1.2 Mechanische Allodynie im „neuropathischen Schmerzmodell“

Zur Darstellung der Entstehung einer mechanischen Allodynie an der linken behandelten Hinterpfote nach einem CCI-Eingriff wurde zunächst vor dem Eingriff die „Baseline“ erstellt. Diese wies sowohl bei den Sham-Tieren als auch bei den anschließend CCI-operierten Tieren keinen Unterschied auf ( $p = 0,8874$ ). 1 h nach dem Eingriff war die Verhaltenstestung aller Tiere durch die Narkosenachwirkungen nicht möglich. Nach 4 h war die PWT von drei CCI-operierten Tieren im Vergleich zu drei Sham-Tieren tendenziell gesunken ( $p = 0,1331$ ). Drei weitere CCI-operierte und drei Sham-Tiere konnten 4 h nach dem Eingriff wegen den Narkosenachwirkungen nicht getestet werden. 1 d nach dem Eingriff war die PWT der CCI-behandelten Tiere signifikant reduziert ( $p = 0,0392$ ) gegenüber der PWT der Sham-Tiere. Jedoch war dieser Unterschied 2 d nach dem Eingriff nur noch tendenziell erkennbar ( $p = 0,1773$ ). 12 d nach dem Eingriff zeigte sich die PWT der CCI-behandelten Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren erneut signifikant erniedrigt ( $p = 0,004$ ) (Abb. 19).

Die PWT der unbehandelten rechten Hinterpfote zeigte keine signifikante Veränderung bei den CCI-operierten Tieren gegenüber den Sham-Tieren. Die „Baseline“ befand sich auf gleichem Niveau ( $p = 0,1567$ ). Auch hier war die Untersuchung der narkotisierten Tiere 1 h nach dem Eingriff nicht möglich. Eine geringe tendenzielle Reduktion der PWT war 4 h nach dem Eingriff feststellbar ( $p = 0,2636$ ). Auch im nachfolgenden Zeitverlauf wurden weder 1 d ( $p = 0,4435$ ), noch 2 d ( $p = 0,9664$ ), noch 12 d nach dem Eingriff ( $p = 0,4053$ ) signifikante Veränderungen der PWT ersichtlich (Abb. 20).

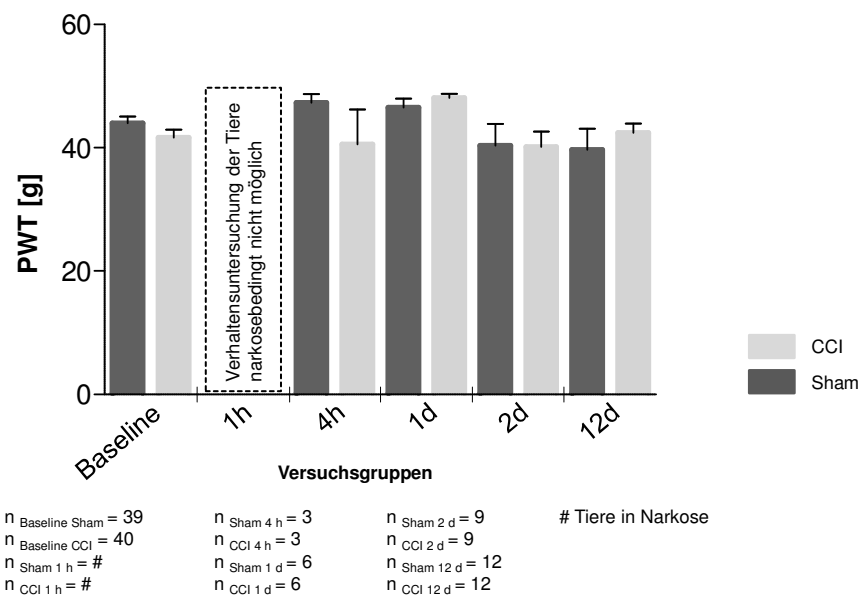
Im „neuropathischen Schmerzmodell“ entwickelte sich somit an der operierten linken Hinterpfote 1 d und 12 d nach dem Eingriff eine messbare signifikante Reduktion der PWT. An der rechten Hinterpfote wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt.

## Ergebnisse



**Abb. 19: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer mechanischen Allodynie an der linken CCI-behandelten Hinterpfote**

Pfotenrückzugsschwellenwert (PWT) der linken behandelten Pfote vor dem Eingriff (Baseline) sowie die verschiedenen Tiergruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt nach dem Eingriff (n = Anzahl der behandelten Versuchstiere zum jeweiligen Zeitpunkt; gepaarter t-Test Sham vs. CCI, Mittelwert + Standardfehler, \*  $p \leq 0,05$  ist signifikant).



**Abb. 20: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer mechanischen Allodynie an der rechten CCI-unbehandelten Hinterpfote**

Pfotenrückzugsschwellenwert (PWT) der rechten unbehandelten Pfote vor dem Eingriff (Baseline) sowie die verschiedenen Tiergruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt nach dem Eingriff (n = Anzahl der behandelten Versuchstiere zum jeweiligen Zeitpunkt; gepaarter t-Test Sham vs. CCI, Mittelwert + Standardfehler).

### 3.1.2 Ergebnisse zur Entwicklung thermaler Hyperalgesie

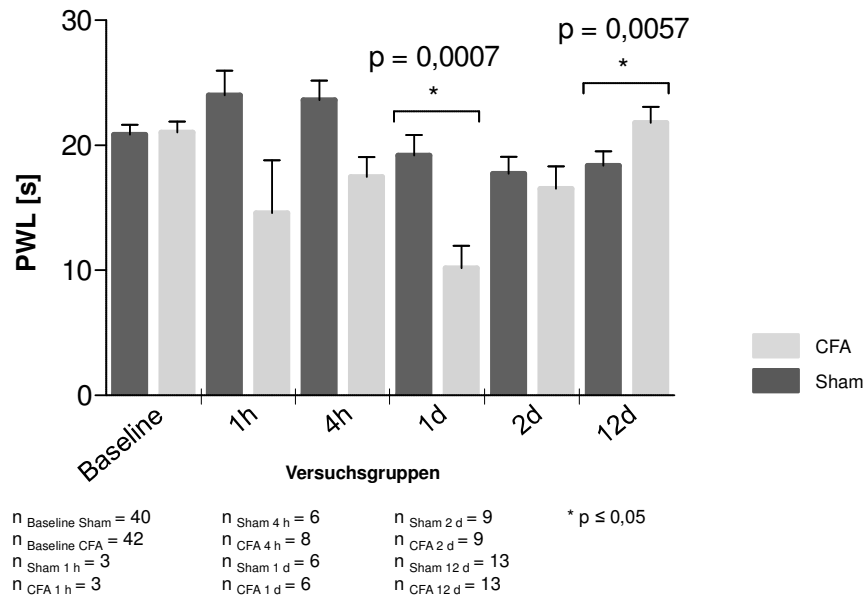
#### 3.1.2.1 Thermale Hyperalgesie im „inflammatorischen Schmerzmodell“

Wiederum wurde vor dem Eingriff die „Baseline“ der Pfotenrückzugslatenz (PWL, *Paw Withdrawal Latency*) der mit CFA zu behandelnden und der Sham-Tiere an der linken Hinterpfote ermittelt. Es ergab sich diesbezüglich kein Unterschied zwischen CFA-Tieren und Sham-Tieren ( $p = 0,7417$ ). Nach CFA-Injektion zeigten drei behandelte Tiere 1 h nach dem Eingriff eine tendenziell reduzierte PWL gegenüber der PWL von drei Sham-Tieren ( $p = 0,695$ ). Drei weitere Sham-Tiere sowie drei CFA-behandelte Tiere konnten 1 h nach dem Eingriff wegen der Nachwirkungen der Anästhesie nicht getestet werden. Die PWL blieb auch 4 h nach dem Eingriff nur tendenziell erniedrigt ( $p = 0,0602$ ). Erst 1 d nach dem Eingriff zeigte sich eine signifikante Reduktion der PWL ( $p = 0,0007$ ). 2 d nach dem Eingriff war der Unterschied nicht mehr signifikant ( $p = 0,6004$ ). Nach 12 d war erneut eine signifikant erhöhte PWL bei den CFA-behandelten Tieren gegenüber ihrer Sham-Gruppe ersichtlich ( $p = 0,0057$ ) (Abb. 21).

Bei den Verhaltensuntersuchungen an der rechten unbehandelten Pfote ergab die „Baseline“ von Sham-Tieren und CFA-Tieren ein ähnliches Niveau ( $p = 0,8083$ ). 1 h nach dem kontralateralen Eingriff vergrößerte sich der Unterschied zwischen CFA- und Sham-Tieren tendenziell ( $p = 0,1076$ ). Dies galt auch für den Zeitpunkt 4 h nach dem Eingriff ( $p = 0,7230$ ). Nur zum Zeitpunkt 1 d nach CFA-Injektion reduzierte sich die PWL der CFA-injizierten Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren signifikant ( $p = 0,0256$ ). 2 d ( $p = 0,1736$ ) und 12 d ( $p = 0,2633$ ) nach dem Eingriff wiesen die CFA-Tiere wiederum nur eine tendenziell leicht verlängerte PWL im Vergleich zu den Sham-Tieren auf (Abb. 22).

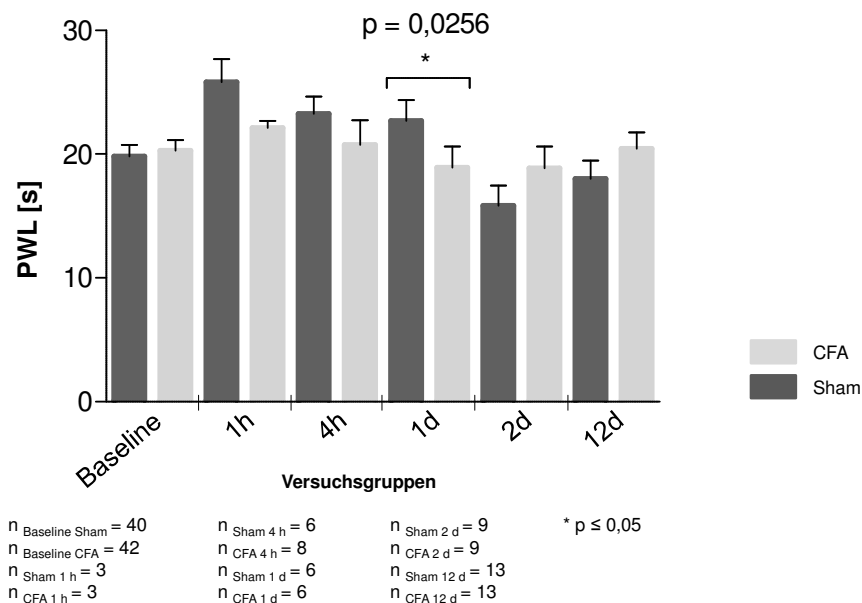
An der linken behandelten Hinterpfote konnte im „inflammatorischen Schmerzmodell“ somit eine messbare signifikante thermale Hyperalgesie nach 1 d und nach 12 d gemessen werden. Ebenfalls signifikante Veränderungen zeigten sich zum Zeitpunkt 1 d nach dem Eingriff an der unbehandelten rechten Pfote.

## Ergebnisse



**Abb. 21: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie an der linken CFA-behandelten Hinterpfote**

Pfotenrückzuglatenz (PWL) der linken behandelten Pfote vor dem Eingriff (Baseline) sowie die verschiedenen Tiergruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt nach dem Eingriff (n = Anzahl der behandelten Versuchstiere zum jeweiligen Zeitpunkt; gepaarter t-Test Sham vs. CFA, Mittelwert + Standardfehler, \*  $p \leq 0,05$  ist signifikant).



**Abb. 22: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie an der rechten CFA-unbehandelten Hinterpfote**

Pfotenrückzuglatenz (PWL) der rechten unbehandelten Pfote vor dem Eingriff (Baseline) sowie die verschiedenen Tiergruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt nach dem Eingriff (n = Anzahl der behandelten Versuchstiere zum jeweiligen Zeitpunkt; gepaarter t-Test Sham vs. CFA, Mittelwert + Standardfehler, \*  $p \leq 0,05$  ist signifikant).

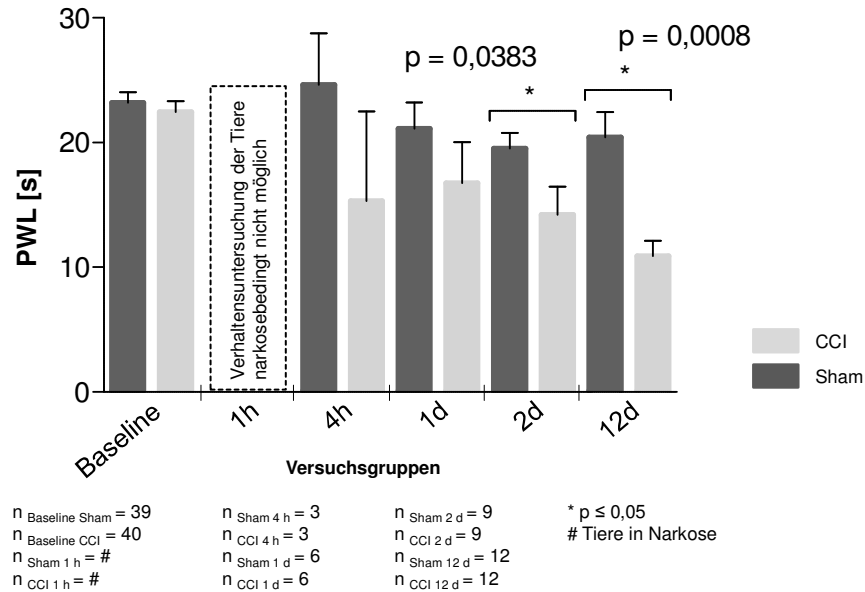
### 3.1.2.2 Thermale Hyperalgesie im „neuropathischen Schmerzmodell“

Für die Sham-Tiere und für die CCI-operierten Tiere wurde zunächst die „Baseline“ der PWL ermittelt. Diese zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p = 0,5840$ ). Die Verhaltensuntersuchung zum Zeitpunkt 1 h war wiederum narkosebedingt nicht möglich. 4 h nach dem Eingriff reduzierte sich die PWL von drei CCI-Tieren tendenziell ( $p = 0,2419$ ). Drei weitere CCI-operierte und drei Sham-Tiere konnten 4 h nach dem Eingriff wegen den Nachkosenachwirkungen nicht getestet werden. Die tendenzielle Reduktion war auch 1 d nach dem Eingriff feststellbar ( $p = 0,3231$ ). Eine signifikant reduzierte PWL der linken behandelten Hintergliedmaße zeigte sich zu den Zeitpunkten 2 d ( $p = 0,0383$ ) und 12 d ( $p = 0,0008$ ) im Vergleich zu Sham operierten Tieren (Abb. 23).

Untersuchungen der rechten Hintergliedmaße zeigten keine erheblichen Abweichungen der PWL zwischen CCI-operierten und Sham operierten Tieren. Die „Baseline“ wies keinen Unterschied auf ( $p = 0,4829$ ). Narkosebedingt war eine Testung der Tiere zum Zeitpunkt 1 h nicht möglich. 4 h nach dem Eingriff war kein Unterschied der Werte der CCI- und der Sham-Tiere feststellbar ( $p = 0,3435$ ). Dies galt auch für die Zeitpunkte 1 d ( $p = 0,0540$ ), 2 d ( $p = 0,2103$ ) und 12 d ( $p = 0,9743$ ) nach dem kontralateralen CCI-Eingriff (Abb. 24).

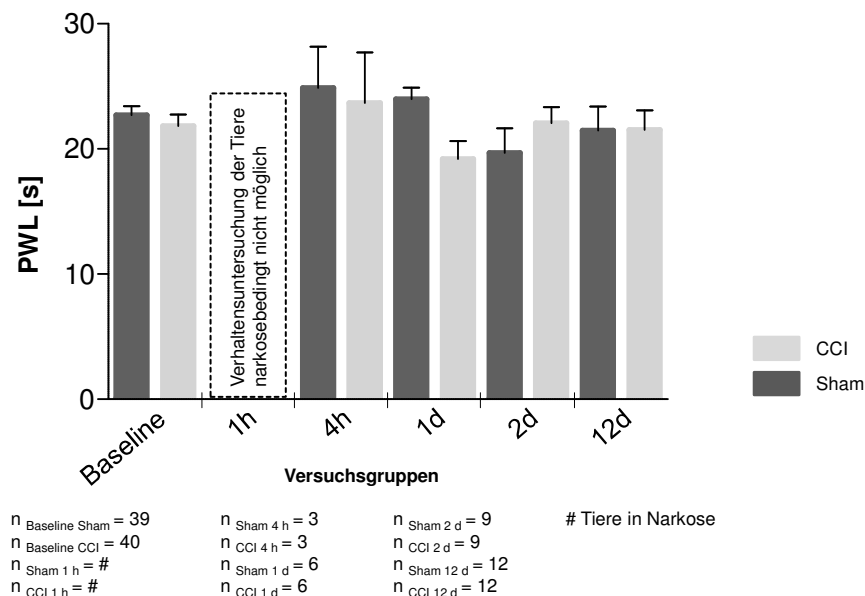
An der linken behandelten Hinterpfote konnte somit 2 d und 12 d nach dem Eingriff im „neuropathischen Schmerzmodell“ thermale Hyperalgesie festgestellt werden. Die rechte unbehandelte Seite zeigte keine signifikanten Veränderungen.

## Ergebnisse



**Abb. 23: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie an der linken CCI-behandelten Hinterpfote**

Pfotenrückzuglatenz (PWL) der linken behandelten Pfote vor dem Eingriff (Baseline) sowie die verschiedenen Tiergruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt nach dem Eingriff (n = Anzahl der behandelten Versuchstiere zum jeweiligen Zeitpunkt; gepaarter t-Test Sham vs. CCI, Mittelwert + Standardfehler, \*  $p \leq 0,05$  ist signifikant).



**Abb. 24: Zeitabhängiger Verlauf der Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie an der rechten CCI-unbehandelten Hinterpfote**

Pfotenrückzuglatenz (PWL) der rechten unoperierten Pfote vor dem Eingriff (Baseline) sowie die verschiedenen Tiergruppen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt nach dem Eingriff (n = Anzahl der behandelten Versuchstiere zum jeweiligen Zeitpunkt; gepaarter t-Test Sham vs. CCI, Mittelwert + Standardfehler).

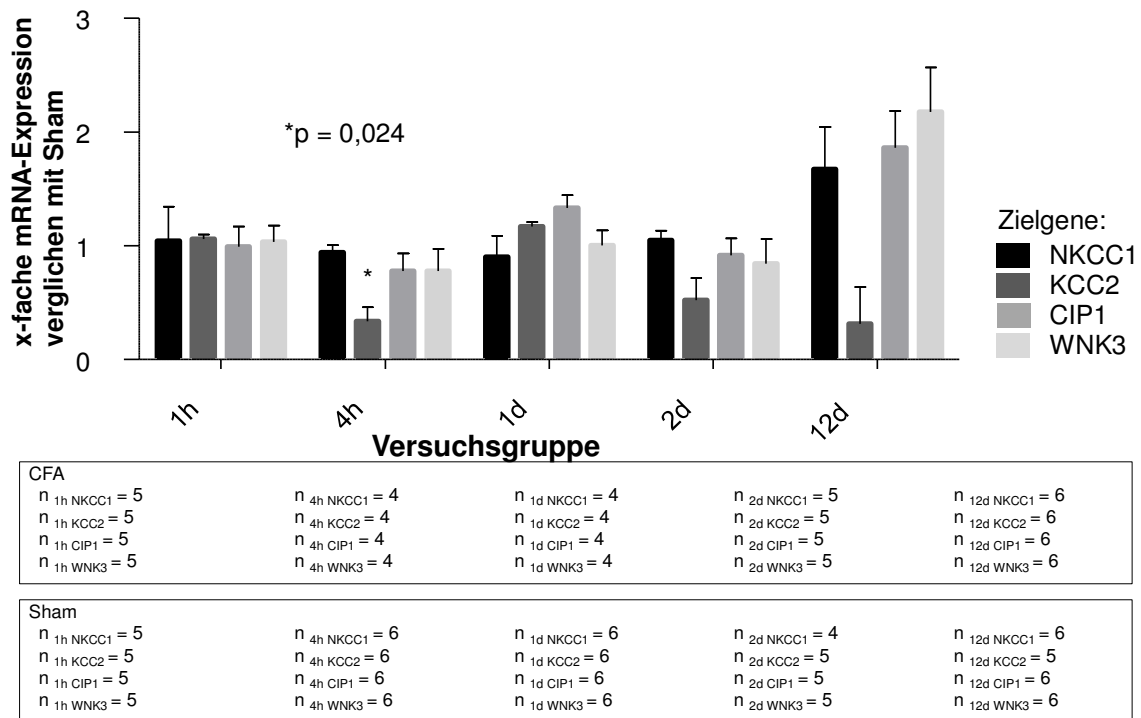
### **3.2 mRNA-Expression spezifischer Zielgene für die Proteine NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 im Zusammenhang mit induzierten inflammatorischen oder induzierten neuropathischen Schmerzen**

#### **3.2.1 mRNA-Expression im „inflammatorischen Schmerzmodell“**

Für die Untersuchungen im „inflammatorischen Schmerzmodell“ wurden im vorgegebenen Zeitverlauf (1 h, 4 h, 1 d, 2 d und 12 d) die relativen mRNA-Expressionsveränderungen für die Proteine NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 mittels rtqPCR analysiert und zwar im lumbalen Rückenmark auf Höhe der Austrittsstelle des *N. ischiadicus* und in den Spinalganglien (L4-L6), ipsilateral zum Eingriff (linke Seite), da hier als erstes Expressionsveränderungen zu erwarten wären.

##### **3.2.1.1 mRNA-Expression im lumbalen Rückenmark nach CFA-Injektion**

Das relative mRNA-Expressionsniveau für NKCC1 nach CFA-Behandlung veränderte sich im Zeitverlauf nicht signifikant verglichen mit den Werten der Sham-Tiere, die = 1 gesetzt wurden. Für KCC2 hingegen zeigte sich eine signifikante Reduktion ( $p = 0,024$ ) der relativen mRNA-Expression 4 h nach CFA-Injektion im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes. Die mittleren relativen mRNA-Werte zu allen übrigen Zeitpunkten waren nicht unterschiedlich zu den = 1 gesetzten Werten der Sham-Tiere. Die relativen mRNA-Expressionsniveaus für CIP1 und für WNK3 nach CFA-Injektion ergaben im vorgegebenen Zeitverlauf keine signifikanten Unterschiede zur jeweiligen Sham-Gruppe (Abb. 25).



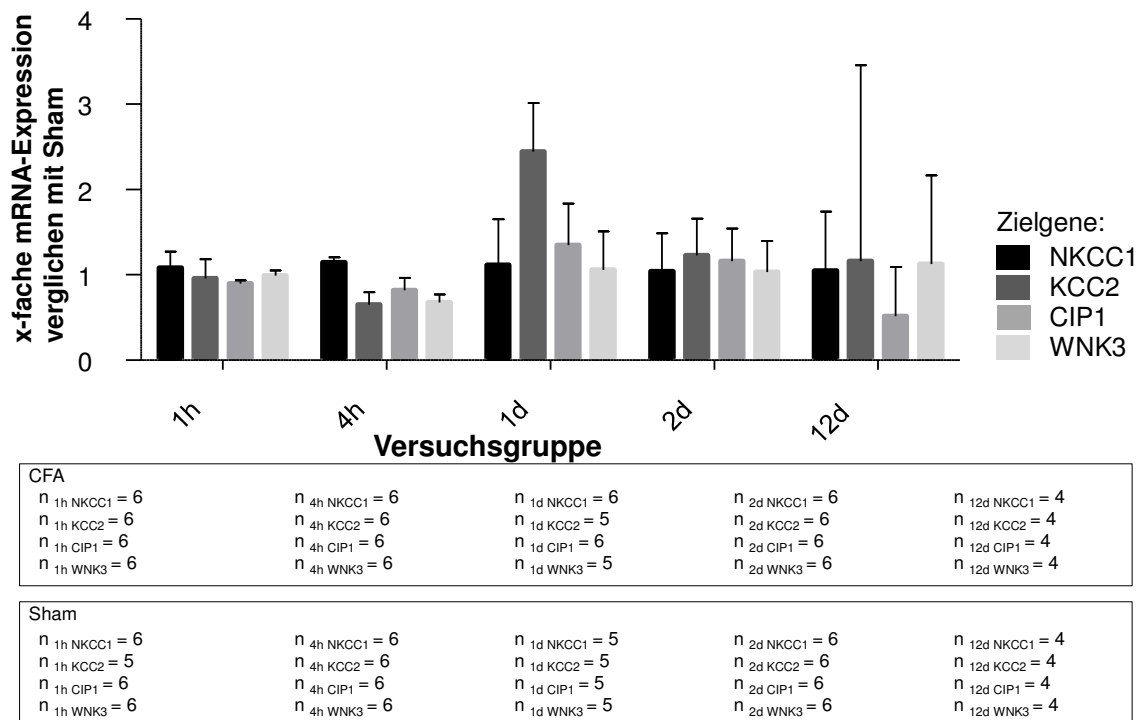
**Abb. 25: Mittlere (+ Standardfehler) relative mRNA-Expression spezifischer Zielgene im linken lumbalen Rückenmark nach CFA-Injektion im vorgegebenen Zeitverlauf**

Relative mRNA-Expression für die Proteine von NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 bei CFA-behandelten Tieren anhand des mittleren Sham-Wertes (= 1 gesetzt); n = Anzahl der behandelten Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt; 4 h nach dem Eingriff zeigt sich der mittlere relative KCC2 mRNA-Wert signifikant reduziert ( $p = 0,024$ ) im Vergleich zum Wert von 1 für die zugehörige Sham-Gruppe.

### 3.2.1.2 mRNA-Expression in Spinalganglien (L4-L6) nach CFA-Injektion

Bei den mRNA-Untersuchungen in den lumbalen Spinalganglien zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede. Nach CFA-Injektion unterschieden sich die mittleren relativen mRNA Expressionsniveaus für die Proteine NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 im Zeitverlauf nicht von denen der ebenfalls im Zeitverlauf behandelten Sham-Tiere (Abb. 26).





**Abb. 26: Mittlere (+ Standardfehler) relative mRNA-Expression spezifischer Zielgene in den linken Spinalganglien (L4-L6) nach CFA-Injektion im vorgegebenen Zeitverlauf**

Relative mRNA-Expression für die Proteine von NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 bei CFA-behandelten Tieren anhand des mittleren Sham-Wertes (= 1 gesetzt); n = Anzahl der behandelten Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt.

## 3.2.2 mRNA-Expression im „neuropathischen Schmerzmodell“

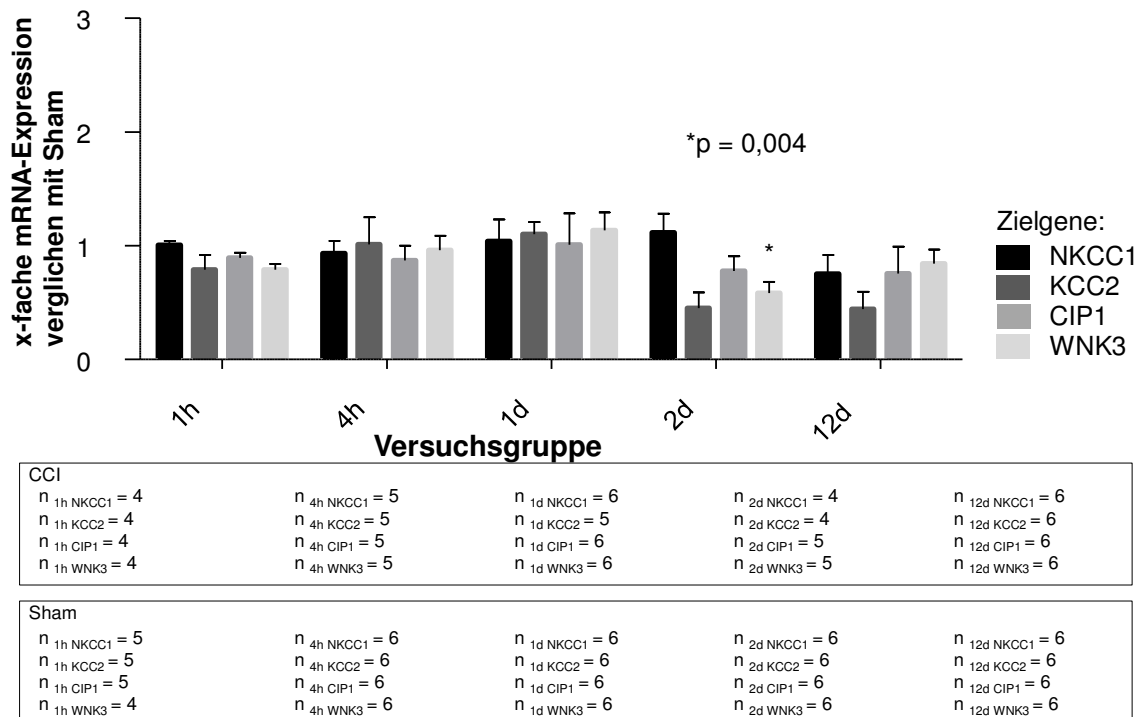
Die mRNA-Expressionsveränderungen für die Proteine NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 wurden nach CCI ebenfalls im vorgegebenen Zeitverlauf mittels rtqPCR erfasst. Sie wurden anhand der Sham-Werte (= 1) relativiert wiedergegeben. Als Untersuchungsmaterial dienten der linke Teil des lumbalen Rückenmarkes und Spinalganglien im Bereich L4-L6.

### 3.2.2.1 mRNA-Expression im lumbalen Rückenmark nach CCI

Nach Durchführung der CCI unterschieden sich die relativen mRNA-Expressionsniveaus für die Proteine NKCC1, KCC2 und CIP1 im vorgegebenen

## Ergebnisse

Zeitverlauf nicht signifikant vom Wert 1 für die jeweiligen Sham-Tiere. Im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes unterschritt 2 d nach CCI-Operation der mittlere relative Wert für die WNK3-mRNA signifikant ( $p = 0,004$ ) den Wert von 1 für die zugehörige Sham-Gruppe (Abb. 27).



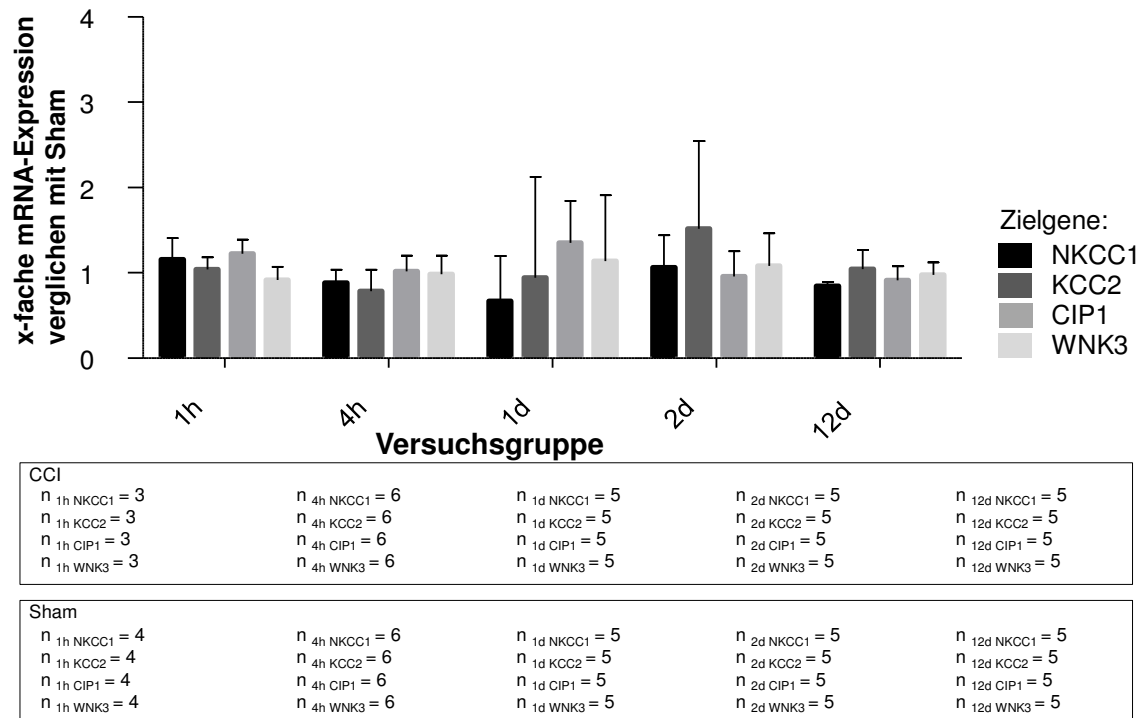
**Abb. 27: Mittlere (+ Standardfehler) relative mRNA-Expression spezifischer Zielgene im linken lumbalen Rückenmark nach CCI im vorgegebenen Zeitverlauf**

Relative mRNA-Expression für die Proteine NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 bei CCI-behandelten Tieren anhand des mittleren Sham-Wertes (= 1 gesetzt); n = Anzahl der behandelten Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt; 2 d nach dem Eingriff zeigt sich der mittlere relative WNK3-mRNA-Wert signifikant reduziert ( $p = 0,004$ ) im Vergleich zum Wert 1 für die zugehörige Sham-Gruppe.

### 3.2.2.2 mRNA-Expression in Spinalganglien (L4-L6) nach CCI

Die Untersuchungen der linken lumbalen Spinalganglien zeigten im vorgegebenen Zeitverlauf nach CCI-Operation im Mittelwert keine signifikanten relativen mRNA-Expressionveränderungen für die Proteine NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 im Vergleich zum Wert 1 der jeweiligen Sham-Tiere (Abb. 28).

## Ergebnisse



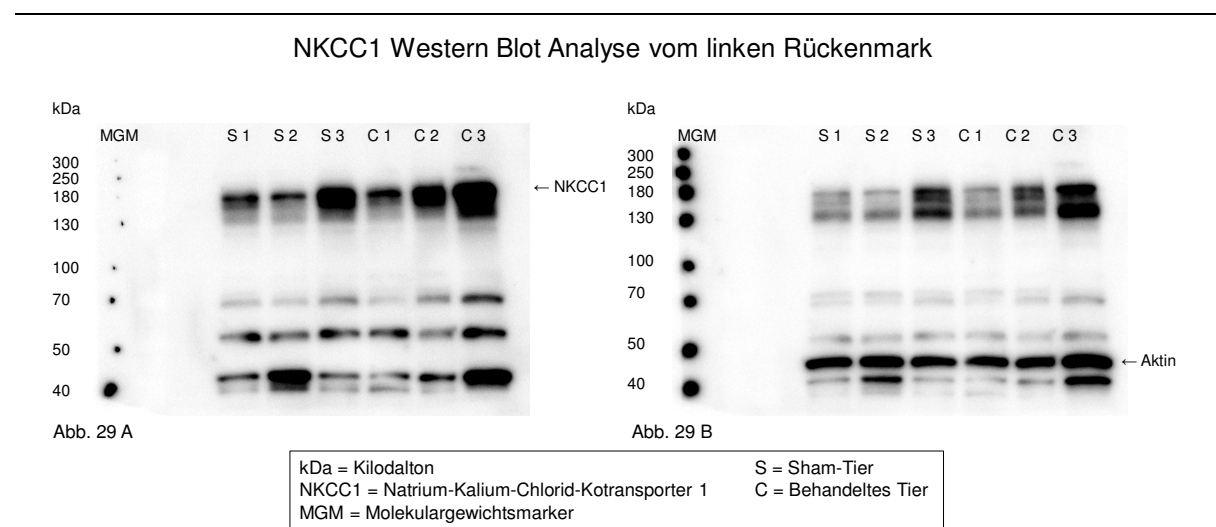
**Abb. 28: Mittlere (+ Standardfehler) relative mRNA-Expression spezifischer Zielgene in den linken Spinalganglien (L4-L6) nach CCI im vorgegebenen Zeitverlauf**

Relative mRNA-Expression für die Proteine NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 bei CCI-behandelten Tieren anhand des mittleren Sham-Wertes (= 1 gesetzt); n = Anzahl der behandelten Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt.

### 3.3 Expression spezifischer Proteine (NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3) im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes im Zusammenhang mit induzierten inflammatorischen oder induzierten neuropathischen Schmerzen

#### 3.3.1 Expression des Proteins NKCC1

Die NKCC1 Proteinexpression wurde auf mögliche Veränderungen im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes auf Höhe der Austrittsstelle des *N. ischiadicus* mittels Western Blot Analyse zwei und zwölf Tage nach dem Eingriff untersucht. Ein Beispiel für eine derartige Analyse von NKCC1 in Rückenmarkproben drei behandelter Tiere im Vergleich zu drei Sham-Tieren zeigt Abb. 29.



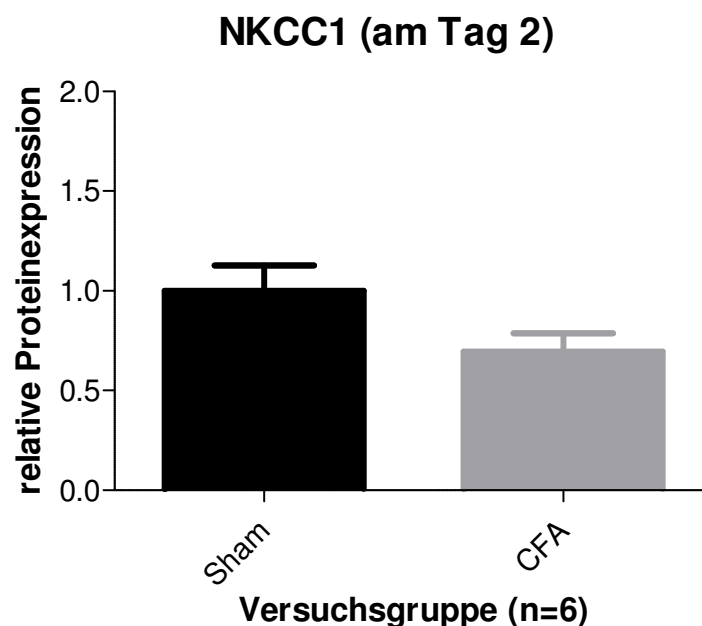
**Abb. 29: Beispielhafte Darstellung der NKCC1-Proteinexpression im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 12 nach CCI-Behandlung bei drei Tieren (C) und bei drei Sham-Tieren (S)**

Mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers (MGM) wurde die Bandenhöhe in Kilodalton (kDa) für NKCC1 (170 kDa) ermittelt (A). Zur Normierung wurde  $\beta$ -Aktin (42 kDa) als *Housekeeper* genutzt (B).

### 3.3.1.1 Expression des NKCC1-Proteins im „inflammatorischen Schmerzmodell“

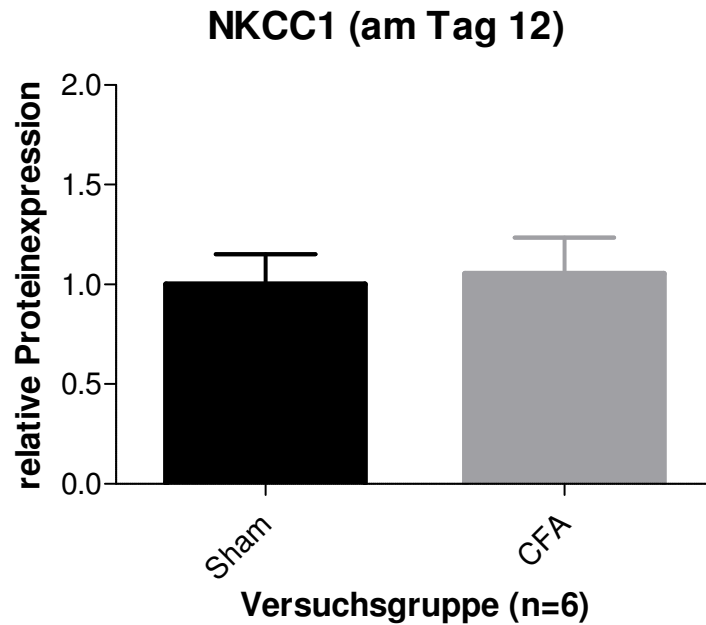
Die Untersuchungen wurden am lumbalen Rückenmark von sechs Tieren mit CFA-Injektion und an sechs Sham-Tieren mit einer Injektion von Kochsalzlösung vorgenommen. Die CFA-induzierten Proteinexpressionen wurden zu den vorgegebenen Zeitpunkten nach Behandlung gemittelt und anhand der Sham-Werte (= 1) relativiert. So zeigten die CFA-behandelten Tiere am Tag 2 einen nahezu signifikant reduzierten NKCC1-Expressionswert im Vergleich zum Wert 1 der Sham-Tiere. Diese Änderung verfehlte mit  $p = 0,0502$  die Signifikanzgrenze von  $* p \leq 0,05$  nur knapp (Abb. 30).

Am Tag 12 zeigten die mit CFA behandelten Tiere auch tendenziell keine Veränderung des mittleren relativen NKCC1-Expressionswertes mehr ( $p = 0,7952$ ) (Abb. 31).



**Abb. 30: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des NKCC1-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 2 nach CFA-Injektion**

Relative NKCC1-Expression anhand des mittleren Sham-Wertes (= 1 gesetzt); Es zeigen sich keine signifikanten Expressionsveränderungen ( $p = 0,0502$ ) ( $n$  = Anzahl der Versuchstiere, gepaarter t-Test Sham vs. CFA).

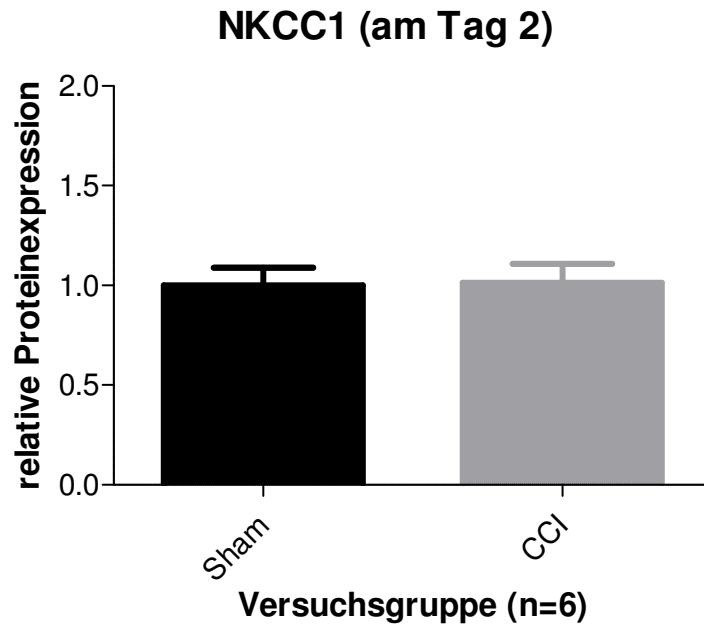


**Abb. 31: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des NKCC1-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 12 nach CFA-Injektion**

Relative NKCC1-Expression anhand des mittleren Sham-Wertes (= 1 gesetzt); Es zeigen sich keine signifikanten Expressionsveränderungen ( $p = 0,7952$ ) ( $n$  = Anzahl der Versuchstiere, gepaarter t-Test Sham vs. CFA).

### 3.3.1.2 Expression des NKCC1-Proteins im „neuropathischen Schmerzmodell“

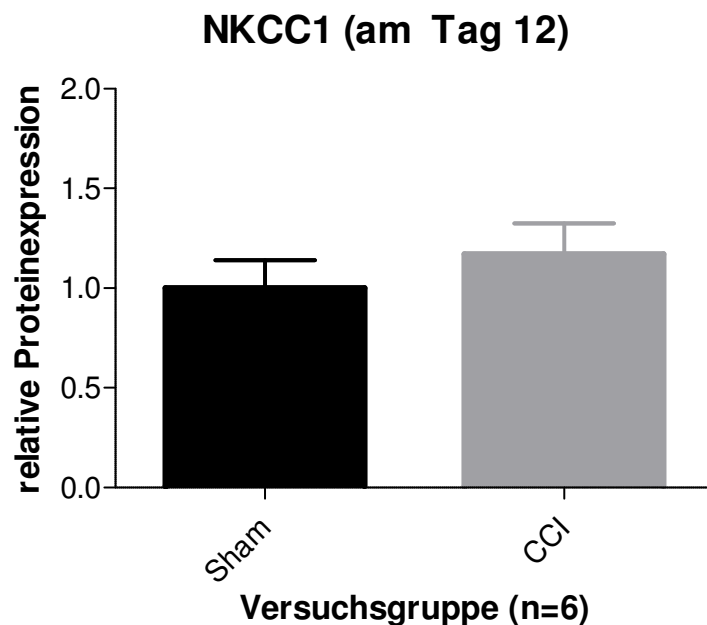
Die Untersuchungen wurden am lumbalen Rückenmark auf Höhe der Austrittsstelle des *N. ischiadicus* von sechs Tieren nach einer CCI-Operation und an sechs Sham-Tieren nach einer Sham-Operation jeweils am Tag 2 und am Tag 12 vorgenommen. Zu beiden Zeitpunkten (2 d:  $p = 0,9034$ , Abb. 32; 12 d:  $p = 0,4515$ , Abb. 33) ergaben sich im Mittel der relativen NKCC1-Proteinexpression nach CCI-Operation keinerlei signifikante Änderungen.



**Abb. 32: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des NKCC1-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 2 nach CCI-Operation**

Relative NKCC1-Expression anhand des mittleren Sham-Wertes (= 1 gesetzt); Es zeigen sich keine signifikanten Expressionsveränderungen ( $p = 0,9034$ ) ( $n$  = Anzahl der Versuchstiere, gepaarter t-Test Sham vs. CCI).

---



**Abb. 33: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des NKCC1-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 12 nach CCI-Operation**

Relative NKCC1-Expression anhand des mittleren Sham-Wertes (= 1 gesetzt); Es zeigen sich keine signifikanten Expressionsveränderungen ( $p = 0,4515$ ) ( $n$  = Anzahl der Versuchstiere, gepaarter t-Test Sham vs. CCI).

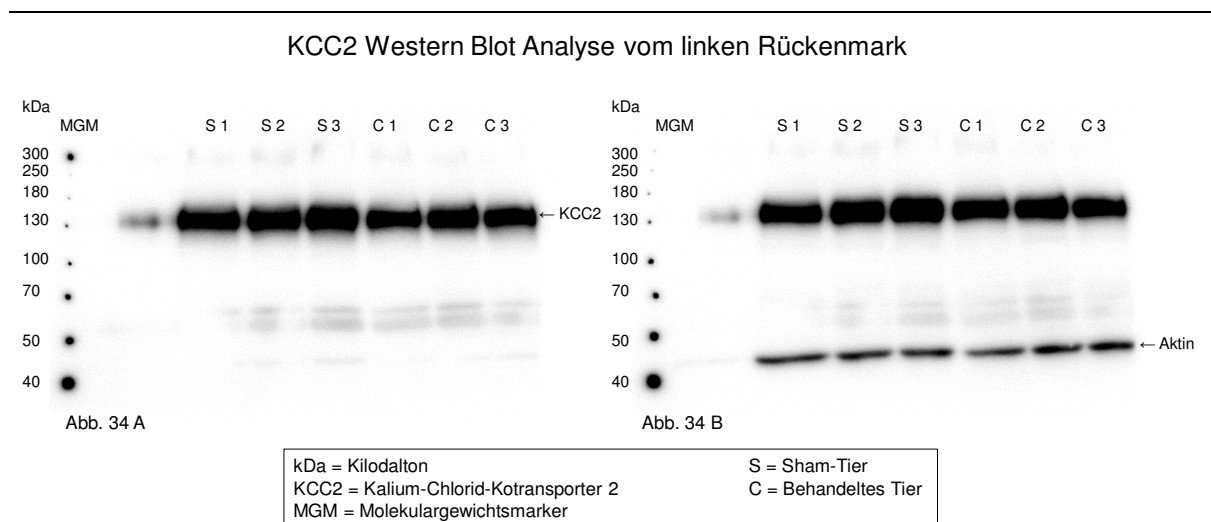
## Ergebnisse

Insgesamt gesehen ergab die Untersuchung der Expression des Proteins NKCC1 an Tag 2 und 12 des „inflammatorischen“ und „neuropathischen Schmerzmodells“ in Relation zum mittleren Sham-Wert (= 1 gesetzt) keinen relativen Unterschied zwischen behandelten und Sham-Tieren. Da kein kommerziell erhältlicher Antikörper zur Verfügung stand, konnte die phosphorylierte aktivierte Form von NKCC1 nicht auf posttranslationale Expressionsveränderungen untersucht werden.

### 3.3.2 Expression des Proteins KCC2

#### 3.3.2.1 Expression des KCC2-Proteins im „inflammatorischen Schmerzmodell“

Die Expression des Proteins KCC2 wurde mittels Western Blot Analyse im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes auf Höhe der Austrittsstelle des *N. ischiadicus* zwei und zwölf Tage nach dem Eingriff untersucht. Ein Beispiel für eine derartige Analyse von KCC2 in Rückenmarkproben von drei behandelten Tieren im Vergleich zu drei Sham-Tieren zeigt Abb. 34.



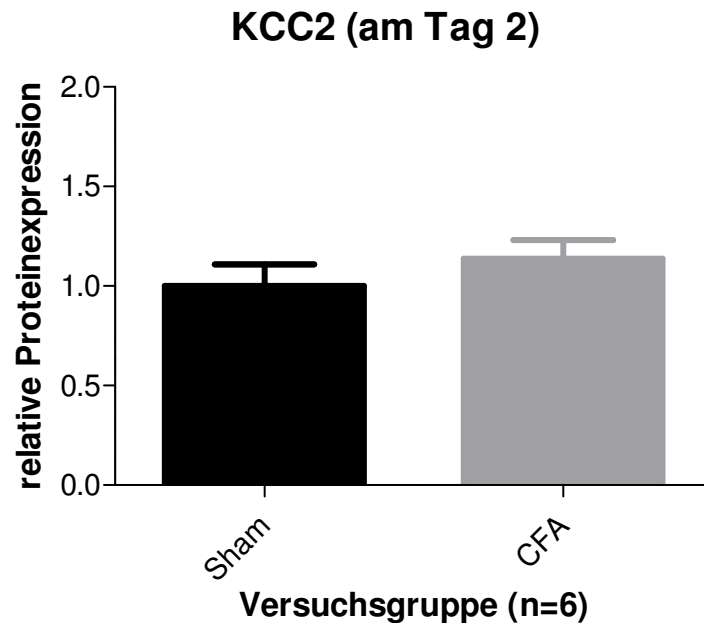
**Abb. 34: Beispielhafte Darstellung der KCC2-Proteinexpression im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 12 nach CFA-Injektion bei drei Tieren (C) und bei drei Sham-Tieren (S)**  
Mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers (MGM) wurde die Bandenhöhe in Kilodalton (kDa) für KCC2 (140 kDa) ermittelt (A). Zur Normierung wurde  $\beta$ -Aktin (42 kDa) als *Housekeeper* genutzt (B).

Bei sechs CFA-behandelten und sechs Sham-Tieren wurde am lumbalen Rückenmark die KCC2-Expression untersucht. Die CFA-induzierten



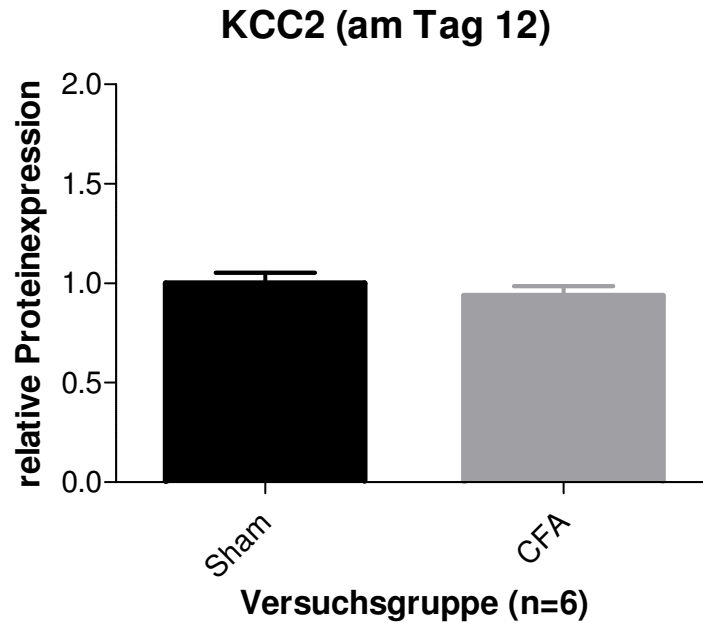
## Ergebnisse

Proteinexpressionen wurden zu den vorgegebenen Zeitpunkten nach Behandlung gemittelt und anhand der Sham-Werte (= 1) relativiert. Weder am Tag 2 (Abb. 35) noch am Tag 12 (Abb. 36) war die mittlere relative KCC2-Expression im Rückenmark der CFA-behandelten Tiere verändert (2 d:  $p = 0,3862$ ; 12 d:  $p = 0,4816$ ).



**Abb. 35: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des KCC2-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 2 nach CFA-Injektion**

Relative KCC2-Expression anhand des mittleren Sham-Wertes (= 1 gesetzt); Es zeigen sich keine signifikanten Expressionsveränderungen ( $p = 0,3862$ ) ( $n$  = Anzahl der Versuchstiere, gepaarter t-Test Sham vs. CFA).



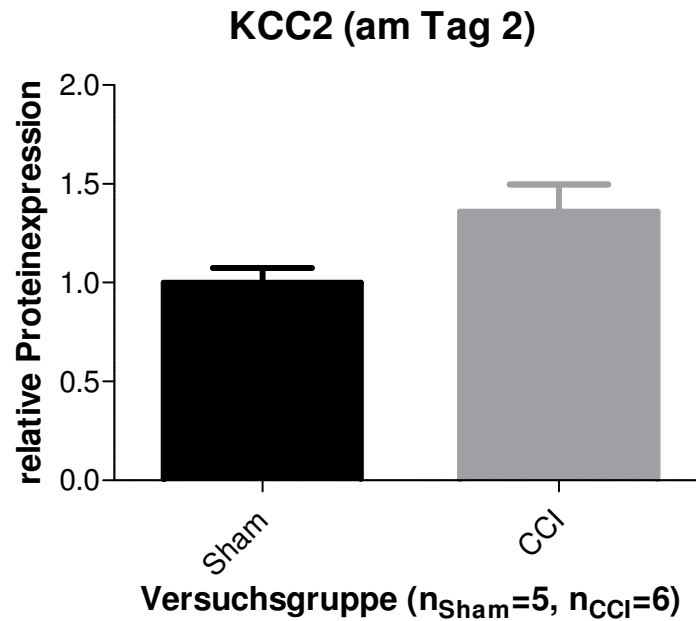
**Abb. 36: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des KCC2-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 12 nach CFA-Injektion**

Relative KCC2-Expression anhand des mittleren Sham-Wertes (= 1 gesetzt); Es zeigen sich keine signifikanten Expressionsveränderungen ( $p = 0,4816$ ) ( $n$  = Anzahl der Versuchstiere, gepaarter t-Test Sham vs. CFA).

### 3.3.2.2 Expression des KCC2-Proteins im „neuropathischen Schmerzmodell“

Die Untersuchungen wurden am lumbalen Rückenmark auf Höhe der Austrittsstelle des *N. ischiadicus* von sechs Tieren nach einer CCI-Operation und an sechs Sham-Tieren vorgenommen. Die Gewebeprobe eines Sham-Tieres war ungeeignet für die Untersuchung im Western Blot. 2 d nach dem Eingriff zeigte sich bei den CCI-operierten Tieren eine tendenziell höhere, aber nicht signifikante mittlere relative KCC2-Expression ( $p = 0,1912$ ) (Abb. 37).

Auch nach 12 d zeigten die CCI-Tiere keine signifikant veränderte relative KCC2-Expression ( $p = 0,4630$ ) (Abb. 38).

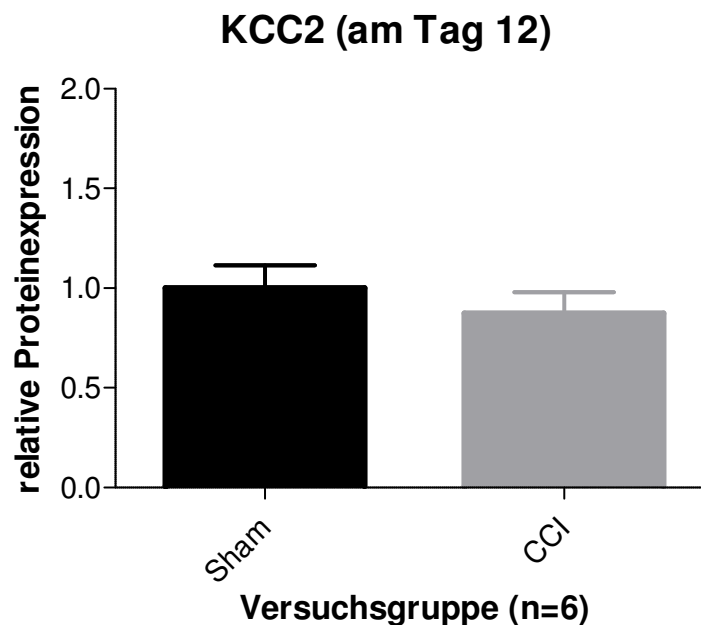


---

**Abb. 37: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des KCC2-Proteins im linken lumbalen Rückenmark am Tag 2 nach CCI-Operation**

Relative KCC2-Expression anhand des mittleren Sham-Wertes (= 1 gesetzt); Es zeigen sich keine signifikanten Expressionsveränderungen ( $p = 0,1912$ ) ( $n$  = Anzahl der Versuchstiere, gepaarter t-Test Sham vs. CCI).

---



---

**Abb. 38: Mittlere (+ Standardfehler) relative Expression des KCC2-Proteins im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes am Tag 12 nach CCI-Operation**

Relative KCC2-Expression anhand des mittleren Sham-Wertes (= 1 gesetzt); Es zeigen sich keine signifikanten Expressionsveränderungen ( $p = 0,4630$ ) ( $n$  = Anzahl der Versuchstiere, gepaarter t-Test Sham vs. CCI).

Insgesamt gesehen zeigte die Expression des Proteins KCC2 weder im „inflammatorischen“ noch im „neuropathischen Schmerzmodell“ einen veränderten relativen Unterschied zwischen behandelten und Sham-Tieren am Tag 2 und am Tag 12 der Untersuchungen.

### **3.3.3 Expression des Proteins CIP1**

Die Untersuchung des relativen Expressionsniveaus von CIP1 im „inflammatorischen“ und im „neuropathischen Schmerzmodell“ konnte trotz intensiver Recherche auf Grund eines nicht verfügbaren Antikörpers mittels Western Blot Analyse nicht durchgeführt werden.

### **3.3.4 Expression des Proteins WNK3**

Für die Untersuchung des relativen Expressionsniveaus von WNK3 im „inflammatorischen“ und im „neuropathischen Schmerzmodell“ wurden vier verschiedene Antikörper (Tab. 13) mittels Western Blot getestet. WNK3 konnte in den durchgeführten Untersuchungen jedoch nicht nachgewiesen werden. Hierbei wurde versucht WNK3 in Leber, Herz, Rückenmark und Gehirn jeweils von Ratten- und Mausgewebe darzustellen. Keiner der vier getesteten Antikörper zeigte WNK3 spezifische Banden.

## Ergebnisse

**Tab. 13: In Maus- und Rattengewebe getestete Antikörper für die Western Blot Analyse des Proteins WNK3**

<b>Antikörper Bestellnummer</b>	<b>Herstellerangaben</b>
WNK3 (orb 13758)	<i>Rabbit polyclonal to WNK3</i> reagiert mit Mensch, Maus, Ratte Biorbyt, Cambridge, United Kingdom
WNK3 (orb 37360)	<i>Peptide affinity purified rabbit polyclonal antibody</i> reagiert mit Mensch Biorbyt, Cambridge, United Kingdom
WNK3 (orb 48045)	<i>Peptide affinity purified rabbit polyclonal antibody</i> reagiert mit Maus Biorbyt, Cambridge, United Kingdom
WNK3 (NBP1-58361)	<i>Rabbit polyclonal antibody</i> reagiert mit Mensch, Maus Novus Biologicals, Cambridge, United Kingdom

## **4 Diskussion**

### **4.1 Zur Eignung der Tierversuche und der dabei gewählten experimentellen und laboranalytischen Vorgehensweise**

#### **4.1.1 Die Ratte als Versuchstier**

Wissenschaftlichen Untersuchungen zur menschlichen Schmerzentstehung sind enge Grenzen gesetzt. Auch bei nur mäßiger Reizeinwirkung dürfen keine irreversiblen Veränderungen hervorgerufen werden. Für tierexperimentelle Untersuchungen zur Schmerzentstehung wurden daher Modelle entwickelt, die menschliche Krankheitszustände nachahmen und gleichzeitig Möglichkeiten zur Quantifizierung von Schmerz anhand von Verhaltensstadien an diesen Versuchstieren bieten (HOGAN, 2002). Im Gegensatz zum Menschen kann in tierexperimentellen Untersuchungen chronischer Schmerz unter standardisierten Bedingungen erzeugt und beobachtet werden. Jedoch verdient die Übertragung von am Tier erzielten Untersuchungsergebnissen auf den Menschen besondere Aufmerksamkeit und Sorgfalt. Zwar ähneln sich die Funktionen von zellulären Vorgängen und Organsystemen, jedoch können speziebedingte Unterschiede, z. B. in der Verstoffwechselung toxischer Substanzen, die Übertragung von neuen Erkenntnissen auf andere Spezies erschweren (MOGIL et al., 2010).

Die Ratte als Versuchstier verursacht geringe Anschaffungs- und Haltungskosten und bietet außerdem eine hohe Reproduktionsrate, so dass sie häufig als Versuchstier genutzt wird (HASENFUSS, 1998). Zwar unterscheiden sich die anatomischen Gegebenheiten bei den verschiedenen Spezies, jedoch ist das Nervensystem der Ratte dem des Menschen ähnlich (ZHANG et al., 2002). Bei der Pathogenese von Krankheitsgeschehen gleichen sich Ratte und Mensch ausreichend, um wertvolle experimentell gewonnene Informationen zu erzielen. Verhaltensuntersuchungen werden bevorzugt an Ratten vorgenommen, da diese im Gegensatz zu Mäusen ein ruhigeres Verhalten zeigen und einfacher zu handhaben

sind. Darüberhinaus bietet die Ratte gegenüber Mäusen den Vorteil einer ausreichenden Körpergröße für neurochirurgische Eingriffe (ABBOTT, 2004) und ermöglicht die Gewinnung einer ausreichenden Gewebemenge für molekularbiologische Untersuchungen.

Es existieren zahlreiche ähnliche bereits durchgeführte tierexperimentelle Studien, die die Ratte als Versuchstier nutzen (BARTHEL, 2012; BRANDENBURGER et al., 2012). Um die Versuchsbedingungen diesen Untersuchungen anzupassen, wurden in vorliegender Arbeit männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von 300-350 g verwendet. Die verwendeten Ratten waren dabei ausschließlich männlichen Geschlechts, um zyklusbedingte Schwankungen in der Sensibilität auszuschließen.

### **4.1.2 Verhaltensuntersuchungen zur Schmerzerfassung**

Die Nutzung des induzierten „inflammatorischen“ oder „neuropathischen Schmerzmodelles“ ist nur dann als erfolgreich zu bezeichnen, wenn die dabei entstehenden Schmerzen reproduzierbar und quantifizierbar sind.

Die tierexperimentelle Nutzung von thermalen und mechanischen Reizen zur Schmerzprovokation erfüllt diese Kriterien und gilt deshalb als eine in der Schmerzforschung etablierte Methode (VIERCK et al., 2008; MOGIL et al., 2010). Allerdings erfolgt hierbei nur die Messung der Schmerzausprägung selbst. Die beim Menschen häufig zusätzlich auftretenden emotionalen, sozialen und andere, die Lebensqualität beeinträchtigenden Aspekte, können jedoch nicht erfasst werden (MOGIL et al., 2010).

#### **4.1.2.1 Zur Testung auf mechanische Allodynie mittels Dynamic Plantar Aesthesiometer®**

Zur reproduzierbaren Darstellung und zur Messung mechanischer Allodynie wurde mittels Dynamic Plantar Aesthesiometer® (Cat. No. 37400, Ugo Basile, Comerio, Italien) die PWT an der *Planta pedis* der Hinterpfoten ermittelt, die mit dem induzierten Berührungsschmerz recht eindeutig korreliert. Bei jedem Tier wurde zur

intraindividuellen Kontrolle sowohl die unbehandelte rechte als auch behandelte linke Hinterpfote an der vorgegebenen standardisierbaren Stelle (Abb. 4) getestet, indem mindestens vier Messwerte erhoben wurden. Das *von Frey-Filament* (FREY, 1996) ermöglicht eine standardisierte, vom Untersucher unabhängige Reizausübung und erlaubt gleichzeitig die Messung der PWT auch bei Schonhaltung der Pfote zuverlässig. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Testung mittels des *von Frey-Filamentes* dem Pfootendrucktest von Randall-Selitto (RANDALL & SELITTO, 1957) vorgezogen, da bei letzterem neben Nozizeptoren weitere Hautrezeptoren aktiviert werden und eine Zwangsfixation mit Einklemmen der Pfote des Versuchstieres zwischen eine Platte und dem Filament erforderlich ist (HOGAN, 2002). Diese Zwangsfixation kann mit einer schwer darstellbaren stressinduzierten Verfälschung der Messwerte einhergehen. Es ist deshalb nicht überraschend, dass die Untersuchung mittels eines Monofilamentes die am meisten genutzte Methode zur Erfassung der mechanischen Allodynie darstellt (HOGAN, 2002). Außerdem scheint ein Lerneffekt der Tiere bei der Randall-Selitto Methode möglich, der ebenfalls die Ergebnisse schwer abschätzbar beeinflussen kann (HARGREAVES et al., 1988). Die dadurch gewährte hohe Verfügbarkeit von ähnlich zustande gekommenen Studienergebnissen erlaubt eine ziemlich gute qualitative und quantitative Beurteilung von neu erzielten Ergebnissen.

#### **4.1.2.2 Zur Testung auf thermale Hyperalgesie mittels Plantar Test®**

Der Plantar Test dient der reproduzierbaren Darstellung und Quantifizierung thermaler Hyperalgesie bei Versuchstieren. Die PWL dient als Maß für Änderungen in der Nozizeption. Eine verringerte Schmerzgrenze spiegelt sich dabei in einer Reduktion der PWL wider. Die Tiere können bei diesem Test dem Wärmereiz jederzeit ungehindert entweichen, so dass eine Sensibilisierung während wiederholter Messungen unwahrscheinlich ist. Die PWL verändert sich durch wiederholte Messungen nicht (HARGREAVES et al., 1988).

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde der Plantar Test 7370® (Ugo Basile, Comerio, Italien) verwendet. Wie bei der Testung auf mechanische Allodynie beschrieben wurden auch hier bei jedem Tier zur intraindividuellen Kontrolle jeweils die rechte und linke Hinterpfote an einer standardisierbaren Teststelle (Abb. 4) auf



ihre PWL vor und nach dem Eingriff (Abb. 7) geprüft. Pro Pfote wurden mindestens vier Messwerte erhoben. Für das korrekte Erheben von Messwerten ist es erforderlich, dass das Tier die zu untersuchende Pfote plan aufsetzt. Dies war bei Tieren, die eine Schonhaltung der Gliedmaße zeigten, nicht immer gewährleistet. Durch einen Luftraum zwischen Infrarotlichtquelle und Pfote erreicht die Wärme letztere später als bei planer Fußung und kann somit zu fehlerhaften Messungen führen.

Der Plantar Test wurde in den vorliegenden Untersuchungen dem *Hot Plate* und dem *Tail Flick* Test vorgezogen, bei denen die Zeit bis zum Ausweichen vor dem Stimulus oder auch bis zum Lecken der Pfote als Zeichen des Schmerzempfindens gemessen wird. In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine Wärmequelle anstelle eines kalten thermalen Reizes genutzt, denn Kältereize rufen weniger standardisierbare Verhaltensreaktionen hervor (HOGAN, 2002).

### **4.1.3 Experimentelle Verfahren zur Schmerzinduktion**

#### **4.1.3.1 Inflammatorischer Schmerz mittels CFA-Injektion**

Die Injektion von *Complete Freund's Adjuvant* in die Hinterpfote gilt als etabliert für die Induktion inflammatorischer Schmerzen (KHAN et al., 2013). CFA induziert eine anhaltende Entzündung der Haut und der Unterhaut und verursacht Schmerzen, die postoperativem Schmerz und Gewebeverletzungen ähneln. Das Modell ist dadurch charakterisiert, dass sich innerhalb von 2-6 h nach der CFA-Injektion eine Entzündung einhergehend mit Allodynie und Hyperalgesie entwickelt, die ihren Höhepunkt nach 6-8 h zeigt. Allodynie, Hyperalgesie und ein lokales Ödem an der Injektionsstelle halten bis zu zwei Wochen an (REN & DUBNER, 1999).

Neben der CFA-Injektion stehen verschiedene weitere Methoden zur Auslösung einer Modellsituation für inflammatorische Schmerzen zur Verfügung. Der Formalintest dient zur Schaffung einer Modellsituation für verletzungsbedingte Schmerzen. Hierbei wird an einer Hinterpfote subkutan Formalin injiziert (ABBOTT et al., 1995), worauf die Tiere für 1 h zwar Schmerzreaktion und Schonhaltung der

Pfote, allerdings keine messbare Allodynie und Hyperalgesie, zeigen (REN & DUBNER, 1999). Auch die Injektion von Karrageen dient zur Auslösung einer Modellsituation für inflammatorischen Schmerz (HUANG et al., 2013) und ruft an der Injektionsstelle in der Fußsohle Ödem und Entzündung, einhergehend mit Allodynie und Hyperalgesie, hervor (KHAN et al., 2013). Bei einmaliger Injektion hält die entzündliche Wirkung weniger als eine Woche an (REN & DUBNER, 1999). Capsaicin-Injektion verursacht eine neurogene Entzündung, die mit Hyperalgesie und Allodynie einhergeht. Zymosan und Senföl lösen nach subkutaner Injektion nur kurz anhaltende Schmerzreaktionen der Tiere aus (REN & DUBNER, 1999).

Auf Grund der sicher und einfach auszulösenden sowie schnell einsetzenden und, wie in der Literatur beschriebenen, bis zu zwei Wochen anhaltenden Allodynie und Hyperalgesie wurde für die hier durchgeführten Untersuchungen die CFA-Injektion zur Auslösung inflammatorischer Schmerzen gewählt. Denn allein diese Modellsituation ermöglichte vergleichende Untersuchungen des inflammatorischen Schmerzes an ein und demselben Tier im zeitlichen Verlauf.

### 4.1.3.2 Neuropathischer Schmerz mittels CCI-Operation

Die *Chronic Constriction Injury* (CCI) wurde durch BENNETT & XIE (1988) als Modellsituation zur Untersuchung neuropathischer Schmerzen etabliert. Bei der CCI werden vier lose Ligaturen um den *N. ischiadicus* geschlungen, die postoperativ Hyperalgesie, Allodynie und Spontanschmerz entstehen lassen (BENNETT & XIE, 1988). Der *N. ischiadicus* eignet sich als gemischter Nerv dafür besonders, weil er die *Planta pedis* der Hinterpfoten sensibel innerviert und so dort ansetzende Testungen der Berührungsempfindlichkeit ermöglicht. Auf Grund seiner Größe ist der *N. ischiadicus* operativ gut zugänglich. Die CCI verursacht ein Absterben von großen myelinisierten Axonen, sowie in geringerem Ausmaß von weniger und nicht myelinisierten Axonen distal der Ligaturen. Innerhalb von 10-14 d nach der Operation entwickeln sich Allodynie und Hyperalgesie, die durch restliche noch funktionierende Fasern vermittelt werden (HOGAN, 2002).

Auch zur Auslösung einer Modellsituation für neuropathischen Schmerz existieren verschiedene andere Methoden. Das *Neuroma Nerve Injury* Modell beruht auf der

vollständigen Ligatur und Durchtrennung des *N. ischiadicus* mit nachfolgender Neurombildung. Das Krankheitsbild ist vornehmlich durch Hypersensibilität des Neuroms auf mechanische Reize und Spontanschmerz geprägt. Die durch den Eingriff ausgelöste Ausbildung ektooper Aktionspotentiale im Spinalganglion proximal der ligierten und durchtrennten Stelle des *N. ischiadicus* verursacht plötzlich auftretenden Schmerz ungeklärter Genese (HOGAN, 2002). Im *Spinal Nerve Ligation* (SNL) Modell, eingeführt von KIM & CHUNG (1992), werden der fünfte und sechste Spinalnerv unmittelbar distal ihres Spinalganglions ligiert. Dies verursacht Spontanschmerz, Allodynie und Hyperalgesie (HOGAN, 2002). Im *Partial Sciatic Nerve Injury* Modell erfolgt die Teilligatur des *N. ischiadicus*, die Spontanschmerz hervorruft und die Schmerzwahrnehmung in beiden Hintergliedmaßen verändert. Hierbei scheint neuropathischer Schmerz von sympathischen Einflüssen abhängig zu sein (SELTZER et al., 1990). Das *Spinal Cord Injury* (SCI) Modell verursacht anhaltenden Schmerz einhergehend mit thermaler Hyperalgesie, mechanischer Allodynie und einer Reduktion der Laufbereitschaft. Für diese Modellsituation gibt es verschiedene Auslöser, wie Kontusion, Hemisektion oder Chemikalien, die eine Verletzung des Rückenmarkes hervorrufen können (HOGAN, 2002).

In der Literatur zeigt sich die Durchführung der CCI als eine häufig genutzte Methode zur Untersuchung neuropathischer Schmerzen. An der Klinik für Anästhesiologie ist das CCI-Modell zur Auslösung neuropathischer Schmerzen seit über zehn Jahren erfolgreich etabliert. Um die Variabilität der durch den Chirurgen bedingten Ligaturfestigkeit auf die damit induzierte Entstehung neuropathischer Schmerzen zu minimieren, wurden in vorliegender Untersuchung die CCI-Eingriffe von einer Person vorgenommen.

### **4.1.4 Molekularbiologische Untersuchungsmethoden**

#### **4.1.4.1 mRNA Analyse mittels rtqPCR**

Die mRNA-Expression für die Proteine NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 wurden in den vorliegenden Untersuchungen mittels rtqPCR (Abb. 8) erfasst. Die rtqPCR wird als Gold-Standard-Methode zur Quantifizierung der mRNA-Expression angesehen

(BÖHM-HOFSTÄTTER et al., 2010). Im Gegensatz zur konventionellen PCR kann bei der rtqPCR die mRNA in Echtzeit quantifiziert werden. Die rtqPCR bietet den Vorteil einer höheren Sensitivität bei der mRNA-Bestimmung als der *Northern Blot* (BÖHM-HOFSTÄTTER et al., 2010) und wurde aus diesem Grund der Analyse mit konventioneller PCR oder *Northern Blot* vorgezogen. Als Referenzgen diente in der vorliegenden Untersuchung  $\beta$ -Aktin.  $\beta$ -Aktin zeigte sich bei tierexperimentell induzierten neuropathischen Schmerzen im Dorsalhorn des Rückenmarkes und in Spinalganglien durch die Intervention unverändert exprimiert und eignet sich somit als Referenzgen zur Erfassung der relativen Genexpression nach Induktion von neuropathischem oder inflammatorischem Schmerz (PILLER, 2013). Auch in den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigte sich  $\beta$ -Aktin unbeeinflusst durch die Intervention. Bei der in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Methode der rtqPCR wurde das TaqMan-Prinzip genutzt, das die Quantifizierung durch Fluoreszenzentstehung in Echtzeit ermöglicht. Ein Vorteil der Verwendung der TaqMan-Sonde besteht in der hohen Spezifität in der Detektion der Zielgene (HOLZAPFEL & WICKERT, 2007), sodass TaqMan wegen der genauen Detektion gewählt wurde.

#### 4.1.4.2 Proteinanalyse mittels Western Blot

Die zu untersuchenden Proteine (NKCC1, KCC2, CIP1, WNK3) wurden mittels Western Blot Analyse erfasst und als Relativwert (zur Kontrolle = 1) dargestellt (Abb. 16). Die Western Blot Analyse ist eine schon lange etablierte Methode (LAEMMLI, 1970), welche eine differenzierte Proteindarstellung mittels spezifischer Antikörper ermöglicht. Um eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Geltaschen mit den Proteinproben zu überprüfen, wurde  $\beta$ -Aktin als *Housekeeper* gewählt. Die Nutzung von  $\beta$ -Aktin als *Housekeeper* Protein setzt voraus, dass seine Expressionslevel unabhängig von den vorgegebenen experimentellen Bedingungen gleich bleiben. Untersuchungen zur Beeinflussung der Expression von  $\beta$ -Aktin nach SCI ergaben einen Anstieg des  $\beta$ -Aktin Expressionsniveaus,  $\beta$ -Tubulin hingegen veränderte sich hierbei nicht und sei deshalb als *Housekeeper* vorzuziehen (LIU & XU, 2006). Bei den für diese Arbeit erstellten Western Blots war keine unterschiedliche  $\beta$ -Aktin-Expression bei Sham-Tieren und behandelten Tieren feststellbar, sodass  $\beta$ -Aktin als *Housekeeper* genutzt werden konnte.

## Diskussion

NKCC1 und KCC2 konnten mittels ihrer spezifischen Antikörper im Rückenmark dargestellt werden. Zur Untersuchung der Expression von CIP1 sowie des Phosphorylierungsstatus von NKCC1 sind bisher keine geeigneten kommerziellen Antikörper für die Western Blot Analyse erhältlich. Die Darstellung von WNK3 im Western Blot mit kommerziell erhältlichen Antikörpern gelang überraschenderweise nicht.

Zur Testung der verfügbaren Anti-WNK3-Antikörper wurden Gehirn, Rückenmark, Herz und Leber von Maus und Ratte untersucht. Trotz ihres Einsatzes nach Herstellerangaben und mehrfacher detaillierter Rücksprache mit den Herstellern, konnten keine reproduzierbaren WNK3-Banden im Western Blot dargestellt werden. Hierbei wurden die Antikörper in der höchsten Konzentration nach Herstellerangaben verwendet und bis zu eine Stunde lang detektiert. Möglicherweise könnte eine weitere Erhöhung der Antikörperkonzentration über die empfohlene Dosis (je nach verwendetem Antikörper beträgt die maximale empfohlene Antikörperkonzentration 1:50) kombiniert mit einer verlängerten Belichtungszeit mehr Aufschluss geben. Eine modulierte Probenaufbereitung, z.B. in Form einer kürzeren Denaturierungsphase bei höheren Temperaturen, könnte für die Untersuchung von WNK3 weitere Erkenntnisse bringen, allerdings wurden die Proben nach Herstellerangaben bearbeitet.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

Chronischer Schmerz ist bei Mensch und Tier ein häufiges Phänomen. Etwa 20 % der erwachsenen europäischen Bevölkerung leidet unter moderaten bis schweren chronischen Schmerzen (BREIVIK et al., 2006). Die Prävalenz neuropathischer Schmerzen beim Menschen wird auf 6,9-10,0 % geschätzt (VAN HECKE et al., 2013). Nur sehr wenige Patienten werden von spezialisierten Schmerztherapeuten behandelt. Bis zu 50 % der Patienten erhalten eine unzureichende Schmerztherapie (BREIVIK et al., 2006; DWORKIN et al., 2007).

Dass Tiere ein dem Menschen ähnliches Schmerzempfinden haben, wurde in der Vergangenheit lange bezweifelt. Die Verhaltensforschung widerlegte diese Annahme und zeigte, dass Tiere sehr wohl Schmerzen und Angst empfinden können. Im Gegensatz zum Menschen können Tiere jedoch das Erfahren von Schmerzen nicht im gleichen Ausmaß kongnitiv erfassen, sodass ein intensives Schmerzerlebnis existenzielle Ängste im Tier auslösen kann (HUSKAMP, 2006. In: DIETZ & HUSKAMP, S. 197-199.). Bei Nutztieren sind Schmerzen oftmals mit hohen Leistungseinbußen verbunden (SHEARER et al., 2013), sodass es aus wirtschaftlichen sowie medizinischen und vor allem tierschützerischen Gründen erforderlich ist, den Tieren eine effektive und zeitnahe Schmerztherapie zu ermöglichen oder bei sehr ungünstiger Prognose eine Euthanasie in Betracht zu ziehen (HUSKAMP, 2006. In: DIETZ & HUSKAMP, S. 197-199).

Die Therapie chronischer Schmerzen ist demnach eine große medizinische, tierschützerische und sozioökonomische Herausforderung und die Ergebnisse sind häufig unbefriedigend. Limitationen hinsichtlich des Erfolgs in der Therapie liegen nicht zuletzt daran, dass die Mechanismen der Pathogenese von Schmerzen insbesondere bei Entzündungen und nach Nervenverletzungen, trotz großer wissenschaftlicher Fortschritte noch sehr unvollständig verstanden sind, so dass gezielte medikamentöse Ansätze bisher noch nicht entwickelt werden konnten, sondern eher auf empirischen oder zufälligen Beobachtungen beruhen (FINNERUP et al., 2005).

Ein besseres Verständnis der Mechanismen für die Chronifizierung von Schmerz, insbesondere die Translation von pathophysiologischen Gegebenheiten in klinische Phänomene, könnte eine wichtige Grundlage für neue, effektive und mechanismus-orientierte Therapieansätze liefern (BARON et al., 2010). Der auslösende Stimulus chronischer Schmerzen, wie eine inflammatorische Noxe (bei chronisch entzündlichen Schmerzen) oder eine Erkrankung oder Läsion im somatosensorischen Nervensystem (bei neuropathischen Schmerzen), führt zu erheblichen, komplexen und stimulus-abhängigen Veränderungen im gesamten somatoafferenten Nervensystem, die schließlich dessen Funktion nachhaltig verändern (COSTIGAN et al., 2009).

Die Funktion des somatosensorischen Systems hängt maßgeblich von inhibitorischer synaptischer Transmission ab. Die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter GABA und Glyzin beeinflussen hierbei die spinale Verarbeitung sensorischer Reizinformationen. Im Dorsalhorn des Rückenmarkes erlauben prä- und postsynaptische Mechanismen mittels GABAerger und glyzinerger Interneurone die Kommunikation zwischen spinalen Endigungen primär sensorischer Fasern und anderen Neuronen des Dorsalhorns (BARDONI et al., 2013). Bei der Entstehung und Aufrechterhaltung chronischer Schmerzen nehmen die hemmenden Interneurone eine Schlüsselrolle ein. In der *Gate Control Theory* wird eine Situation beschrieben, bei der hemmende Interneurone im Dorsalhorn des Rückenmarkes den Weg peripherer nozizeptiver Signale auf dem Weg ins ZNS modifizieren (MELZACK & WALL, 1965). D. h., periphere Reizinformationen werden von inhibitorischen Interneuronen kontrolliert, um eine selektive Weiterleitung von Schmerzinformationen in höhere Zentren des ZNS und deren bewusste Wahrnehmung zu regulieren. Pathologisch bedingte neuronale Modifikation wie eine Reduktion GABAerger und glyzinerger Interneurone führen zur Entstehung inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen. Durch die intrathekale Injektion von Strychnin kann diese Hemmung der inhibitorischen Neurotransmission mit nachfolgender gesteigerter Schmerzwahrnehmung hervorgerufen werden. Nach einer peripheren Gewebeverletzung scheinen Cytokine im Dorsalhorn des Rückenmarkes freigesetzt zu werden, die die Aktivierung von Mikroglia induzieren. Infolgedessen könnte BDNF an die Rezeptoren von Neuronen im Dorsalhorn des Rückenmarkes binden und durch eine Reduktion der KCC2-Expression eine neuronale Depolarisation

begünstigen. Möglicherweise könnte auch die Apoptose hemmender Neurone im Dorsalhorn zur spinalen Inhibition führen (ZEILHOFER et al., 2012).

Die in der neuronalen Zellmembran lokalisierten Kation-Chlorid-Cotransporter sind wesentliche Bestandteile der inhibitorischen Neurotransmission, so auch im Rückenmark (ZHANG et al., 2008). Sie regulieren die neuronale Chloridhomöostase und beeinflussen den Chloridfluss durch den GABA<sub>A</sub>-Kanal (PRICE et al., 2005). Sie ermöglichen somit die inhibitorische Wirkung von GABA bei Chlorideinstrom in die Zelle und dadurch ausgelöster Hyperpolarisation der Zellmembran (KAHLE et al., 2005). Pathologische Veränderungen der Kation-Chlorid-Cotransporter nach Entzündung oder Nervenschädigung modulieren die Chloridhomöostase (KAHLE et al., 2010) und beeinflussen somit die Entstehung und Aufrechterhaltung von Allodynie und Hyperalgesie (PRICE et al., 2009). Neuropathischer Schmerz kann mit einer Entzündung des peripheren oder zentralen Nervensystems einhergehen. Hierbei stimulieren und sensibilisieren Entzündungsmediatoren das Nervensystem auf peripherer und zentraler Ebene und können im Rahmen einer maladaptiven Plastizität neuropathische Schmerzen fördern (ELLIS & BENNETT, 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Kation-Chlorid-Cotransporter NKCC1 und KCC2 sowie zwei ihrer möglichen Regulatoren, CIP1 und WNK3, bei inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen im Zeitverlauf untersucht. Dies sollte zum besseren Verständnis der Entstehung und Aufrechterhaltung chronischer Schmerzen beitragen und gleichzeitig mögliche neue Angriffspunkte für optimierte, mechanismus-orientierte Therapieansätze für Mensch und Tier aufzeigen.

### **4.2.1 Zum Nachweis von mechanischer Allodynie und thermaler Hyperalgesie im „inflammatorischen“ und im „neuropathischen Schmerzmodell“**

Im „inflammatorischen Schmerzmodell“ zeigten die mittels des Aesthesiometer<sup>®</sup> durchgeführten Untersuchungen an der behandelten linken Hinterpfote bereits vier Stunden nach der Injektion von CFA eine um 35 % signifikant reduzierte Reizschwelle gegenüber den Befunden bei der Sham-Gruppe (Abb. 17). Die



Entstehung mechanischer Allodynie bei einer experimentell induzierten inflammatorischen Schmerzsituation konnte somit nachgewiesen werden. Im weiteren Zeitverlauf konnte mittels des Plantar Test<sup>®</sup> am Tag 1 nach CFA-Injektion eine um 47 % signifikant erniedrigte, und am Tag 12 eine um 19 % signifikant erhöhte Pfotenrückzugslatenz im Vergleich zu den mit Kochsalz injizierten Sham-Tieren festgestellt werden (Abb. 21). Somit konnte die Entstehung thermaler Hyperalgesie am Tag 1 nach CFA-Injektion nachgewiesen werden.

Ergebnisse anderer Untersuchungen zur CFA-Injektion demonstrierten, dass CFA, wie in den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen, innerhalb von 2-6 h nach der Injektion sowohl Allodynie als auch Hyperalgesie auf der ipsilateralen Seite auslöst, die dann bis zu zwei Wochen anhält (REN & DUBNER, 1999). Die lokale Anwesenheit einer inflammatorischen Noxe induziert dort innerhalb von Minuten eine entzündliche Reaktion (TIZARD, 2004, S. 10-48). So entwickelten männliche Sprague-Dawley Ratten zwischen 5 und 25 h nach Injektion von 100 µl CFA mechanische Hyperalgesie (FANG et al., 2013). In einer weiteren inflammatorischen Schmerzsituation durch die Injektion von 20 µl Karrageen bzw. CFA in die *Planta pedis* trat am vierten Tag nach dem Eingriff gegenüber der Sham-Gruppe eine signifikant erniedrigte Pfotenrückzugsschwelle auf das *von Frey-Filament* auf (HUANG et al., 2013). Bei Untersuchungen an Mäusen sank im durch Zymosaninjektion in die *Planta pedis* (20 µl von 10 mg/ml) induzierten „inflammatorischen Modell“ der Schwellenwert 5-6 h nach der Injektion auf die Hälfte der „Baseline“ ab und stieg anschließend bis 24 h nach der Injektion nur noch geringgradig wieder an (RUSSE et al., 2013).

In den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen erhöhte sich die Pfotenrückzugslatenz am Tag 12 nach CFA-Injektion um 19 % gegenüber den Kontrolltieren. Möglicherweise entwickelte sich hier innerhalb von zwölf Tagen eine Defunktionalisierung der Neurone, wie sie nach Capsaicin Injektion beobachtet wurde (SHARMA et al., 2013). Nach einer bald abklingenden schmerzempfindlichen Sensibilisierung zeigen sich die Neurone refraktär und reagieren nicht mehr auf vorher noch schmerzhafte Stimuli. Auf eine derartige Defunktionalisierung der Neurone als langfristige Wirkung einer CFA-Injektion, könnte die verlängerte Pfotenrückzugslatenz in vorliegender Untersuchung hindeuten. Möglicherweise zeigt

die um 19 % erhöhte Pfotenrückzugslatenz aber auch nur, dass die induzierte thermale Hyperalgesie in den durchgeführten Untersuchungen weniger als 12 d anhielt und der auslösende Reiz mittels CFA keine Wirkung mehr zeigte.

Die Verhaltensuntersuchungen der linken behandelten Pfote zeigten somit, dass durch die CFA-Injektion sich innerhalb von 24 Stunden sowohl thermale Hyperalgesie als auch mechanische Allodynie entwickelte. 12 Tage nach CFA-Injektion zeigten die behandelten Tiere keine Anzeichen einer mechanischen Allodynie mehr, da ihr Pfotenrückzugsschwellenwert sich dem Niveau der „Baseline“ wieder angeglichen hatte. 12 Tage nach CFA-Injektion zeigten die behandelten Tiere keine thermale Hyperalgesie mehr, sondern zeigten sich vielmehr unempfindlicher auf einen thermischen Reiz verglichen mit ihrer „Baseline“ und den Kontrolltieren.

Die Literaturrecherche ergab, dass vorangegangene Untersuchungen mittels CFA-Injektion in die *Planta pedis* bei Ratten und Mäusen (REN & DUBNER, 1999; HUANG et al., 2013) ebenfalls nach 2-6 h mechanische Allodynie und thermale Hyperalgesie festgestellt hatten, die 14 d lang anhielt. Zur Untersuchung der Entstehung von mechanischer Allodynie und thermaler Hyperalgesie wurden hierbei *von Frey-Filamente*, der Plantar Test sowie der *Hot* und *Cold Plate* Test verwendet. Die abweichenden Messungen der mechanischen Allodynie und thermalen Hyperalgesie nach 12 bzw. 14 Tagen entstehen vor allem durch die unterschiedlichen Methoden der Verhaltenstestungen, Versuchstierspezies und ihre geschlechts- und rasseabhängige Schmerzempfindlichkeit. Außerdem beeinflussen die chemischen Eigenschaften, die Injektionskonzentration und das -volumen des verwendeten injizierten Mittels das Ausmaß der induzierten Gewebeentzündung. Um zu überprüfen, ob die nach 12 Tagen hervorgerufene Unempfindlichkeit auf thermale Reize ein dauerhafter oder temporärer Effekt ist, wäre eine Untersuchung über einen mehrwöchigen Zeitraum mit Verhaltenstestungen an jedem oder jedem zweiten Tag sinnvoll. Die Entwicklung von mechanischer Allodynie und thermaler Hyperalgesie nach 12 Tagen wies auf eine mögliche unterschiedliche Wahrnehmung von qualitativ verschiedenen Schmerzreizen hin. Mechanische und thermale Reize werden durch A $\delta$ - und C-Fasern vermittelt (D'MELLO & DICKENSON, 2008), inwiefern die Nervenfasertypen möglichen inflammatorisch induzierten Veränderungen in der

Wahrnehmung verschiedener Reize unterliegen, könnte eine histologische Untersuchung erfassen.

Überraschenderweise war im „inflammatorischen Schmerzmodell“ der vorliegenden Studie bei der Testung der unbehandelten rechten Hinterpfote auf mechanische Allodynie zwei Tage nach CFA-Injektion der Schwellenwert gegenüber dem der Sham-Gruppe um 39 % signifikant erhöht (Abb. 18). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie zeigten die mit CFA behandelten Tiere bei REN & DUBNER (1999) auf der kontralateralen Seite keine Veränderung des Schwellenwertes auf Reizung durch *von Frey-Filamente*. Es ist anzunehmen, dass die Schonhaltung einer erkrankten Gliedmaße zur Überlastung der gesunden kontralateralen Gliedmaße führt und Veränderungen des Bewegungsmusters induziert (STASHAK, 2010, S. 100-156). Die in vorliegender Arbeit untersuchten Tiere haben möglicherweise die mit CFA behandelte schmerzende linke Hinterpfote entlastet und somit die rechte Pfote vermehrt belastet. Um durch ein Anheben der rechten Pfote dem Reiz des *von Frey-Filamentes* auszuweichen, müsste die entzündete linke Pfote erneut vorübergehend belastet werden. D. h., das trotz des Reizes verlängerte Verweilen auf der gesunden Pfote könnte eine Vermeidungsreaktion zur Entlastung der schmerzhaften Pfote darstellen.

In den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf thermale Hyperalgesie zeigte sich bei den mit CFA behandelten Tieren am Tag 1 an der unbehandelten rechten Pfote eine signifikante Verkürzung der Pfotenrückzugslatenz um 17 % verglichen mit dem Kontrollwert der Sham-Gruppe (Abb. 22). Möglicherweise waren die Tiere in unseren Untersuchungen schmerzbedingt gestresst und reagierten mit einer generell gesteigerten Erregbarkeit auf äußere Einflüsse (AURICH & BAUMGARTNER, 2009, S. 47-49). Weiterhin ist die Möglichkeit von kontralateralen Effekten durch die CFA-Injektion nicht auszuschließen. Nach peripherer lokaler Nervenläsion, z. B. an einer Extremität, scheinen auch kontralateral neuronale Veränderungen in geringerer Ausprägung und von kürzerer Dauer auftreten zu können. Dies könnte vermutlich auf einem zentralen Mechanismus chemischer transmedianer Signalübermittlung beruhen (KOLTZENBURG et al., 1999). Ähnliche transmedianer Effekte wurden bei lokal induzierter Arthritis an Ratten beobachtet (DONALDSON et al., 1993; DONALDSON, 1999). Hier verursachte die intraartikuläre

Injektion von CFA nach 14 Tagen eine kontralaterale Arthritis. Ebenfalls wurde durch subkutane Injektion von CFA am Tibiotarsalgelenk von Ratten die Entstehung einer Arthritis induziert, die sich innerhalb von zehn Tagen zu einer bilateralen Arthritis entwickelte (MORALES-AZA et al., 2004). Bei Untersuchungen an Ratten verursachte die Injektion von 100 µl CFA in die Hinterpfote unmittelbar einsetzende und 14 Tage lang anhaltende thermale Hyperalgesie und mechanische Allodynie (ZHANG et al., 2008). Veränderungen auf der kontralateralen Seite wurden hierbei nicht beobachtet. In den von uns durchgeführten Behandlungen zur Induktion von inflammatorischem Schmerz wurden 50 µl CFA injiziert. Möglicherweise existiert ein dosisabhängiger Effekt des injizierten CFA auf Ausprägungsstärke bzw. –zeit der dadurch induzierten mechanischen Allodynie und thermalen Hyperalgesie.

Die Effekte eines an einer Extremität Schmerz auslösenden Eingriffes auf die kontralaterale Extremität erfahren in der Literatur unterschiedliche Berücksichtigung. Die Mehrzahl der Studien beschränkt sich dabei auf die Untersuchung an der behandelten Extremität. Dabei scheint die Untersuchung des Zusammenhangs von ipsi- und kontralateralen Effekten weitreichende Erkenntnisse über das Ausmaß von inflammatorischen Schmerzen aufzeigen zu können (DONALDSON et al., 1993; KOLTZENBURG et al., 1999; MORALES-AZA et al., 2004). Die für diese Arbeit durchgeführten Verhaltensuntersuchungen an der rechten unbehandelten Pfote lassen ebenfalls einen Effekt an der kontralateralen Gliedmaße vermuten. Für diese Effekte könnten verschiedene Ursachen verantwortlich sein. So könnten überbelastungsbedingte (STASHAK, 2010, S. 100-156) oder stressbedingte (AURICH & BAUMGARTNER, 2009, S 47-49) Gründe die kontralaterale Messung der Schmerzempfindlichkeit beeinflussen. Von Bedeutung scheint auch die Entwicklung einer neurogenen Entzündung mit transmedianen Auswirkungen auf die neuronale Signalübermittlung zu sein, die sich in kontralateralen Veränderungen der Schmerzempfindlichkeit darstellen könnte (DONALDSON et al., 1993; KOLTZENBURG et al., 1999; MORALES-AZA et al., 2004).

Nach einem Tag entwickelte sich im „neuropathischen Schmerzmodell“ dieser Arbeit bei den CCI-operierten Tieren an der linken behandelten Pfote mechanische Allodynie (Abb. 19) und nach zwei Tagen thermale Hyperalgesie (Abb. 23). 12 Tage nach der CCI-Operation waren sowohl mechanische Allodynie als auch thermale

Hyperalgesie weiterhin feststellbar. Auf der rechten kontralateralen Seite zeigten sich keine Veränderungen der Schmerzempfindlichkeit (Abb. 20, Abb. 24).

Die CCI-Operation gilt als eine häufig genutzte Methode zur Induktion einer chronisch peripheren Mononeuropathie. Thermale Hyperalgesie bildet sich nach fünf bis sieben Tagen bei 85 % der Tiere aus; nach acht bis zehn Tagen zeigen 100 % der Tiere nach CCI-Operation eine thermale Hyperalgesie an der behandelten Seite (BENNETT & XIE, 1988). Die kontralaterale Seite zeigt keine Veränderungen (BENNETT & XIE, 1988). Auch HOGAN beschreibt, dass nach 10-14 Tagen mechanische Allodynie nachweisbar wird (HOGAN, 2002). Untersuchungen der Arbeitsgruppe der Klinik für Anästhesiologie konnten diese Ergebnisse bestätigen. Bei CCI-operierten transgenen Mäusen entwickelte sich innerhalb von knapp zwei Wochen an der operierten Pfote eine ausgeprägte mechanische Allodynie sowie thermale Hyperalgesie (HERMANN et al., 2009). Weiterhin war in Untersuchungen an Wistar Ratten nach CCI eine deutliche Entwicklung mechanischer Allodynie an der betroffenen Hinterpfote innerhalb von einigen Stunden bis knapp zwei Wochen sichtbar. Die rechte unbehandelte Pfote blieb dabei unbeeinflusst (BRANDENBURGER et al., 2012).

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Beobachtungen der vorangegangenen Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Entwicklung von mechanischer Allodynie und thermaler Hyperalgesie am Tag 12 nach CCI-Operation festgestellt, da der Pfotenrückzugsschwellenwert der CCI-operierten Tiere um 41 % und die Pfotenrückzugslatenz um 47 % im Bezug zu den Kontrolltieren signifikant gesunken waren. Allerdings war schon am Tag 1 die Pfotenrückzugsschwelle der linken Pfote der CCI-behandelten Tiere um 22 % gegenüber den Sham-Tieren signifikant gesunken. Auch die Pfotenrückzugslatenz der CCI-operierten Tiere sank am Tag 2 um 27 % im Vergleich mit den Kontrolltieren signifikant ab. Thermale Hyperalgesie und mechanische Allodynie manifestieren sich erst zwischen 5-14 Tagen nach dem CCI-Eingriff (BENNETT & XIE, 1988; HOGAN, 2002), sodass die hier gemessene gesteigerte Schmerzempfindlichkeit Folge des operativen Traumas sein könnte. Die Verhaltensuntersuchungen nach einer CCI-Operation werden durch postoperative inflammatorische Komponenten, postoperativen Schmerz und postoperativen Stress beeinflusst (HOGAN, 2002). Die postoperative Wundheilung

beinhaltet bis zum fünften Tag inflammatorische Prozesse (RYTZ, 2004. In: KRAMER, S. 274-277), sodass die frühe Reduktion der gemessenen Schwellenwerte auf postoperativen entzündlichen Wundschmerz und Stress zurückzuführen sein könnte und nicht Ausdruck der Entwicklung von mechanischer Allodynie und von thermaler Hyperalgesie ist.

### **4.2.2 Zur mRNA-Expression für spezifische Proteine (NKCC1, KCC2) und potentieller Regulatoren (CIP1, WNK3) im „inflammatorischen“ und im „neuropathischen Schmerzmodell“**

In den für diese Arbeit durchgeführten laboranalytischen Untersuchungen an lumbalem Rückenmark und lumbalen Spinalganglien (L4-L6) veränderte sich im Vergleich zum mRNA-Niveau der Kontrolltiere weder im „inflammatorischen“ noch im „neuropathischen Schmerzmodell“ die mRNA-Expression für das Protein NKCC1 im vorgegebenen Zeitverlauf (Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27, Abb. 28).

Untersuchungen der NKCC1-mRNA-Expression an Mäusen ergaben ebenfalls im „inflammatorischen Modell“, unmittelbar nach Formalininjektion keine veränderte Expression im Dorsalhorn des Rückenmarkes (WU et al., 2009) und werden durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen bestätigt. Nach Arthritisinduktion bei Ratten durch CFA wurde hingegen ein erhöhtes mRNA-Expressionslevel für das Protein NKCC1 nach vier und zehn Tagen im Dorsalhorn des Rückenmarkes festgestellt (MORALES-AZA et al., 2004). In den Spinalganglien war dagegen auch im Arthritismodell die NKCC1-mRNA-Expression unverändert (MORALES-AZA et al., 2004). Die Diskrepanz der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann darauf zurückzuführen sein, dass MORALES-AZA et al. (2004) in das Tibiotarsalgelenk 100 µl CFA injizierte und Tag 4 und 10 nach der Intervention untersuchte. Somit kennzeichnet diese Studie sowohl eine andere Wahl des Injektionsortes, als auch die doppelte Injektionsmenge an CFA und die Expressionsanalyse zu anderen Zeitpunkten als in der vorliegenden Arbeit. Besonders durch die doppelte Menge an CFA wird ein deutlich stärkerer Reiz auf das Tier ausgeübt, der auch zu einer deutlicheren reaktiven Änderungen der mRNA-Expression von NKCC1 führen könnte

und möglicherweise in einem Zeitfenster stattfindet, das die vorliegende Arbeit nicht erfasst.

Im „neuropathischen Schmerzmodell“ bei Ratten veränderte sich die NKCC1-mRNA-Expression im dorsalen motorischen Kern des *Nervus vagus* ipsi- und kontralateral der induzierten axonalen Vagusverletzung nicht (NABEKURA et al., 2002). Dies wurde durch die vorliegende Arbeit bestätigt. Neurone der Spinalganglien haben in der Regel eine höhere NKCC1-Expression des Transportproteins als andere Neurone des ZNS (ZEILHOFER et al., 2012). NKCC1 scheint zur Schmerzentstehung beitragen zu können (PRICE et al., 2005), jedoch stehen die Schmerz induzierenden Vorgänge möglicherweise nicht im Zusammenhang mit Expressionsveränderungen der für NKCC1 spezifischen mRNA, sondern könnten mehreren anderen Mechanismen unterliegen. Mögliche mRNA-Expressionsveränderungen von NKCC1 könnten überdies Ursache oder auch Folge einer veränderten Schmerzwahrnehmung sein, weshalb die vorliegende Arbeit Untersuchungen im Zeitverlauf vornimmt. So könnte z. B. der entscheidende schmerzspezifische Beitrag von NKCC1 auch zu einem späteren Zeitpunkt stattfinden, und zwar sobald eine gesteigerte Produktion von NKCC1 vorliegt oder eine funktionelle posttranslationale Modifikation z. B. durch Phosphorylierung. Diese Möglichkeit veranlasste uns in vorliegender Arbeit insbesondere auch das fertige Protein NKCC1 zu erfassen und semiquantitativ darzustellen.

Ein Ergebnis dieser Arbeit war, dass sich die mRNA-Expression für KCC2 im lumbalen Rückenmark vier Stunden nach Beginn der CFA-induzierten Entzündung auf 34 % der KCC2-Expression der Sham-Tiere reduziert zeigte (Abb. 25). Im Gegensatz dazu zeigten ältere Untersuchungen im „inflammatorischen Modell“ einen KCC2-mRNA-Anstieg im Dorsalhorn vier Tage nach CFA-induzierter Arthritis bei Ratten (MORALES-AZA et al., 2004). Nach Formalininjektion ergaben sich wiederum unterschiedliche Ergebnisse bei der mRNA-Analyse: So wurde 5 und 30 min nach intraplantarer Formalininjektion bei Sprague-Dawley Ratten keine Veränderung des KCC2-mRNA-Expressionsniveaus im lumbalen Rückenmark festgestellt (NOMURA et al., 2006). Andere Untersuchungen ergaben jedoch, dass 5 min nach subkutaner Formalininjektion unter die Oberlippentasthaare von Mäusen die KCC2-mRNA im Dorsalhorn der *Medulla oblongata* ipsilateral zur Seite der Injektion vorübergehend

um 41 % reduziert exprimiert wurde und nach 30 min wieder auf das Niveau der Sham-Tiere anstieg (WU et al., 2009). Die Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse zu den Veränderungen in der mRNA-Expression von KCC2 könnten auf der Verwendung verschiedener Entzündungsauslöser, wie Formalin und CFA, sowie deren Injektionsmenge und den Injektionsort zurückzuführen sein. Auch untersuchen die aufgeführten Studien die KCC2-mRNA-Expression in anderen Zeitintervallen. Eine zeitlich dynamische Expressionsänderung der mRNA von KCC2 mit einer frühen Reduktion der Expression gefolgt von einem Expressionsanstieg auf ein mittelfristig erhöhtes mRNA-Expressionsniveau wäre ebenfalls denkbar.

Im „neuropathischen Schmerzmodell“ zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der KCC2-mRNA. Jedoch zeigen anderweitige Studien nach traumatisch ausgelösten neuropathischen Schmerzen eine Reduktion der KCC2-mRNA. So wurde sieben Tage nach traumatischer Hirnverletzung eine Abnahme der KCC2-mRNA-Expression auf 56 % der Expression der Sham-Tiere festgestellt (BONISLAWSKI et al., 2007). Nach axonaler Vagusverletzung und neuropathischer Schmerzsituation halbierte sich nach 1-3 Tagen die KCC2-mRNA-Expression auf der ipsilateralen Seite im dorsalen Vaguskern in Bezug zu der Expression der Sham-Tiere (NABEKURA et al., 2002). Die Diskrepanz der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zu den aufgeführten Studienergebnissen könnte auf der Wahl anderer Methoden zur Auslösung neuropathischer Schmerzen beruhen. All dies deutet darauf hin, dass KCC2 eine wichtige Rolle bei der inflammatorischen und neuropathischen Schmerzentstehung zu spielen scheint (PRICE et al., 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der KCC2-mRNA-Expression deuten darauf hin, dass KCC2 durch mRNA-Expressionsveränderungen innerhalb weniger Tage nach Intervention an einem chronischen Schmerzgeschehen beteiligt sein könnte. Um den Zusammenhang von KCC2-mRNA auf inflammatorische und neuropathische Schmerzen genauer zu identifizieren, könnte eine tierexperimentelle Untersuchung an Ratten mit CFA- bzw. CCI-Intervention im Zeitverlauf über eine Woche mit täglicher Gewebegewinnung des Rückenmarkes auf Höhe der Austrittsstelle des *N. ischiadicus* und anschließender mRNA-Expressionsanalyse neue Erkenntnisse über die möglicherweise zeitpunktabhängige Expressionsveränderung bringen.



In den für diese Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen wurden keine Veränderungen der CIP1-mRNA-Expression im „inflammatorischen“ und „neuropathischen Schmerzmodell“ festgestellt (Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27, Abb. 28). Erste Hinweise auf mögliche regulative Effekte durch CIP1 zeigten *in vitro* Untersuchungen mit CIP1, in denen es einen reziproken Einfluss auf die Transportaktivität von NKCC1 und KCC2 ausübte (CARON et al., 2000; WENZ et al., 2009). So demonstrierten z. B. Untersuchungen an *Xenopus laevis* Oocyten inhibierende Effekte von CIP1 auf die NKCC1-Aktivität. D. h., CIP1 könnte als ein möglicher Inhibitor von NKCC1 in Betracht gezogen werden (CARON et al., 2000). Im Zusammenhang mit KCC2 hingegen bewirkte CIP1 eine deutliche Steigerung von 59 % (Nierenzellen mit KCC2-Expression) auf 173 % (Nierenzellen mit KCC2- und CIP1-Coexpression) des KCC2 vermittelten Chloridausstromes im Bezug zu Kontrollzellen bei menschlichen embryonalen Nierenzellen (WENZ et al., 2009). *In vivo* Untersuchungen zu CIP1 liegen bisher nicht vor, sodass die vorliegende Arbeit diese vielversprechende Untersuchung anstellt. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch keine Hinweise auf einen regulativen Einfluss von CIP1-mRNA auf die Expression von NKCC1 und KCC2 auf.

Die Versuchsbedingungen zwischen *in vivo* und *in vitro* unterscheiden sich erheblich, so berücksichtigen *in vitro* Versuche die komplexen Einflüsse des Gesamtorganismus auf die vielzähligen physiologischen biochemischen Vorgänge nicht. Die idealisierten *in vitro* Verhältnisse können lediglich Hinweise auf mögliche *in vivo* stattfindende Zusammenhänge geben, die jedoch eine *in vivo* Überprüfung erfordern. Die artifiziell hergestellte CIP1-Coexpression in der Zellkultur spiegelt möglicherweise nicht das *in vivo* vorliegende CIP1-Expressionsniveau wider und regulierende Effekte von CIP1 auf NKCC1 und KCC2 könnten durch eine Überexpression provoziert worden sein. Auch lässt der regulative Effekt von CIP1 auf die Transportaktivität von NKCC1 und KCC2 nicht direkt auf Veränderungen in der mRNA-Expression schließen. In dieser Arbeit wurde der *in vitro* erfasste regulative Zusammenhang (WENZ et al., 2009; CARON et al., 2000) von CIP1-mRNA auf NKCC1 und KCC2 *in vivo* überprüft. Zu den vorgegebenen Zeitpunkten waren keine Veränderungen in der Expression von CIP1-mRNA zu verzeichnen, sodass eine mögliche Beteiligung von CIP1 an der Regulation von NKCC1 und KCC2 nicht abschließend geklärt werden konnte.

Die WNK3 spezifische mRNA-Expression war nach zwei Tagen im „neuropathischen Schmerzmodell“ der vorliegenden Untersuchung im lumbalen Rückenmark auf 59 % in Bezug auf die Sham-Tiere reduziert (Abb. 27). WNK3 zeigte in *in vitro* Untersuchungen unterschiedliche Wirkung auf die NKCC1- und die KCC2-Transportproteinaktivität (KAHLE et al., 2006; KAHLE et al., 2010), allerdings liegen bisher keine *in vivo* Untersuchungen vor. So steigerte WNK3 bei Ionenflussmessungen die NKCC1-Transportaktivität und hemmte die KCC2-Transportaktivität. Unklar ist, ob WNK3, zunächst veranlasst durch hypertone intrazelluläre Bedingungen und verringerte intrazelluläre Chloridkonzentration, phosphoryliert und dadurch aktiviert werden muss (KAHLE et al., 2010). Ein direkter Zusammenhang der Expressionsveränderung der WNK3-mRNA mit NKCC1 oder von KCC2 konnte in den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht gezeigt werden.

Wie bei CIP1 ist hier die erhebliche Diskrepanz zwischen *in vivo* und *in vitro* Versuchsbedingungen zu berücksichtigen. Hinweise aus den aufgeführten *in vitro* Untersuchungen (KAHLE et al., 2006; KAHLE et al., 2010) benötigen die Verifikation im lebenden Gesamtorganismus, um seine Einflüsse auf biochemische Vorgänge einzuschließen. Die künstlich hervorgerufene Expression von WNK3 zusammen mit NKCC1 und KCC2 stellt möglicherweise Untersuchungen an, bei denen ein abweichendes Verhältnis der Expressionslevel von WNK3, NKCC1 und KCC2 verglichen mit den physiologischen Bedingungen vorliegt. Somit könnten die Untersuchungen Effekte aufweisen, die möglicherweise unter natürlichen Bedingungen nicht stattfinden. Auch geben die Effekte von WNK3 auf die Transportaktivität von NKCC1 und KCC2 mittels Ionenflussmessungen Hinweise auf einen möglichen regulativen Zusammenhang von WNK3 auf NKCC1 und KCC2, der nicht zwingend auf einer veränderten mRNA-Expression beruhen muss, sondern sich auch über eine Aktivitätssteigerung der Ionentransporter manifestieren könnte. Die Rolle von WNK3 als ein möglicher *in vivo* Regulator von NKCC1 und KCC2 konnte in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Jedoch lieferte die vorliegende Arbeit *in vivo* erste Hinweise darauf, dass WNK3 über eine Reduktion seiner mRNA-Expression möglicherweise als Regulator im Zusammenhang mit neuropathischen Schmerzen stehen könnte.

#### **4.2.3 Zur Expression spezifischer Proteine (NKCC1, KCC2) im „inflammatorischen“ und im „neuropathischen Schmerzmodell“**

Im „inflammatorischen Schmerzmodell“ der vorliegenden Untersuchung waren nach zwei und zwölf Tagen keine Expressionsveränderungen bei den für NKCC1 und KCC2 spezifischen Proteinen im linken Teil des lumbalen Rückenmarkes feststellbar (Abb. 30, Abb. 31, Abb. 35, Abb. 36). Untersuchungen im lumbalen Dorsalhorn von Ratten (ZHANG et al., 2008), zeigten einen Tag nach der Injektion von CFA in die Hinterpfote eine ipsilaterale Reduktion des KCC2-Expressionsniveaus von 19 % und nach 14 Tagen von 46 % (von Ratio 1,61 auf Ratio 1,31 am Tag 1 und auf Ratio 0,87 am Tag 14), wohingegen die NKCC1-Expression unverändert blieb. Eine reduzierte KCC2-Expression könnte demnach durch Hemmung des neuronalen Chloridaustromes an der Entstehung und Aufrechterhaltung inflammatorischer Schmerzen beteiligt sein (ZHANG et al., 2008). Die Diskrepanz zwischen den in vorliegender Arbeit erzielten Ergebnissen zu NKCC1 und KCC2 und den Ergebnissen von ZHANG et al., könnte darauf beruhen, dass ZHANG zur Erzeugung der Entzündung der Hinterpfote die doppelte Menge CFA verglichen mit der in der vorliegenden Studie injizierte und das Dorsalhorn aus dem Rückenmark zur Western Blot Analyse isolierte. Bei CFA-induzierter Arthritis (MORALES-AZA et al., 2004) zeigte NKCC1 im immunhistochemischen Nachweis eine vermehrte Proteinexpression (Daten werden nicht genannt) nach CFA-Behandlung im Dorsalhorn des Rückenmarkes von Ratten, wohingegen die Western Blot Analyse keine Expressionsveränderung darstellte. Die Proteinexpression von KCC2 zeigte dort immunhistochemisch vier Tage nach CFA-Injektion einen signifikanten Anstieg (Daten werden nicht genannt) und fiel anschließend wieder auf Normalniveau zurück. Im Western Blot zeigte sich die KCC2-Expression unverändert (MORALES-AZA et al., 2004). Da die vorliegende Arbeit den Zeitpunkt 4 Tage nach der Intervention nicht untersucht, sondern die Proteine am Tag 2 und Tag 12 analysiert, könnte ein möglicher vorübergehender Anstieg 4 Tage nach der Intervention unentdeckt geblieben sein. Die Bedeutung der Effekte einer gleichzeitigen vermehrten Proteinexpression der entgegengesetzt arbeitenden Chloridtransporter NKCC1 und KCC2 ist bisher nicht geklärt (ZEILHOFER et al., 2012). Möglicherweise könnte ein entzündungsbedingter Anstieg der KCC2-Expression Auslöser für ein reaktives Ansteigen der NKCC1-Expression sein, um die erhöhte KCC2-Wirkung zu

kompensieren. Die Ausprägung des inflammatorischen Schmerzes wird durch die jeweils injizierte Substanz, das Injektionsvolumen und die Substanzkonzentration maßgeblich beeinflusst. So zeigte ein experimenteller Ansatz zur induzierten Entzündung des *N. ischiadicus* (CHACUR et al., 2001) dosisabhängige Auswirkungen auf die Ausprägung der Schmerzentstehung nach der Injektion von Zymosan in die Hinterpfote.

Im für diese Arbeit induzierten „neuropathischen Schmerzmodell“ zeigte sowohl die NKCC1- als auch KCC2-Proteinexpression nach zwei und zwölf Tagen keine Veränderungen (Abb. 32, Abb. 33, Abb. 37, Abb. 38). Frühere Untersuchungen (BLAESSE et al., 2009; HASBARGEN et al., 2010) hingegen zeigten mit Western Blot Analyse, dass 14 Tage nach SCI mittels Quetschung des Rückenmarkes eine um 40 % reduzierte KCC2-Expression zu beobachten war, und zwar einhergehend mit einer um 60 % erhöhten NKCC1-Expression. Die daraus entstehende Erhöhung des intrazellulären Chloridgradienten könnte so zur Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen beitragen (HASBARGEN et al., 2010). Nach induzierter peripherer Nervenschädigung durch Abschnüren des *N. ischiadicus* von Ratten halbierte sich die KCC2-Proteinexpression ipsilateral zum Eingriff im Rückenmark verglichen mit der kontralateralen KCC2-Proteinexpression (COULL et al., 2003). Die Quetschung des Rückenmarkes bei der SCI sowie das vollständige Abschnüren des *N. ischiadicus* stellen invasivere Methoden zur Auslösung neuropathischen Schmerzes dar als die für diese Arbeit durchgeführte Ligatur des *N. ischiadicus* in der CCI. Das Ausmaß der experimentell induzierten neuronalen Gewebeschädigung scheint im Zusammenhang mit einer möglichen nachfolgenden Veränderung der Proteinexpression von NKCC1 und KCC2 zu stehen.

Die aufgeführten Untersuchungen zeigen, dass immunhistochemische Untersuchungen eines Gewebeschnittes und Western Blot Analysen z.T. die Proteinexpression unterschiedlich darstellen. Während die immunhistochemische Analyse vor allem zur Darstellung der Proteinlokalisierung genutzt wird, stellt die Western Blot Analyse eine semiquantitative Untersuchung der Proteinexpression an. Die Expression und Regulation von NKCC1 und KCC2 scheint gewebespezifisch verschieden zu sein. So könnte das Heraustrennen des Dorsalhorns ein Vorteil gegenüber der Untersuchung des gesamten Rückenmarkabschnittes sein, da im

Dorsalhorn die schmerzleitenden Fasern enden, sodass das Dorsalhorn eine wichtige Lokalisation bei der Regulation der Schmerzweiterleitung sein könnte. Auch ist zu berücksichtigen, dass die Existenz eines Proteins nicht unbedingt auch Rückschlüsse auf seine Funktion zulässt (BLAESSE & NOTHWANG, 2008). Insbesondere posttranslationale Modifikationen der Proteine könnten Einfluss auf die Schmerzentwicklung nehmen. So scheint KCC2 als aktives Oligomer oder transportinaktives Monomer vorliegen zu können. Es scheint, dass NKCCs durch Phosphorylierung aktiviert und KCCs dadurch inaktiviert werden. Diese entgegengesetzte Funktion, je nach Phosphorylierungszustand von NKCC1 und KCC2, beruht vermutlich auf ihrer reziproken Wirkung auf die zelluläre Chloridhomöostase. Die Phosphorylierung von KCC2 durch die Proteinkinase C scheint hierbei eine Ausnahme zu sein, da sie KCC2 durch Phosphorylierung aktiviert. Darüberhinaus scheinen WNK1 über die *Oxidative Stress-Responsive Kinase* (OSR1) und WNK4 über die *Ste20-Related Kinase* (SPAK) den Phosphorylierungszustand von NKCC1 und KCC2 beeinflussen zu können. Dephosphorylierende Phosphatasen könnten somit ebenfalls die Aktivität von NKCC1 und KCC2 modulieren, allerdings sind solche bisher noch nicht identifiziert (BLAESSE & NOTHWANG, 2008).

Um weitere Erkenntnisse über die Aktivität von NKCC1 und KCC2 im phosphorylierten und dephosphorylierten Zustand und ihre möglichen Beeinflussung inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen zu gewinnen, ist es notwendig die Phosphorylierungsstellen zu lokalisieren. Erst mittels spezifischer Antikörper gegen diese Phosphorylierungsstellen ist es möglich, einen potentiellen Zusammenhang von phosphoryliertem NKCC1 und KCC2 auf inflammatorische und neuropathische Schmerzen zu erfassen (BLAESSE & NOTHWANG, 2008).

### 4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten im induzierten „inflammatorischen Schmerzmodell“ nach vier Stunden eine auf 30 % reduzierte KCC2-mRNA-Expression im lumbalen Rückenmark auf Höhe der Austrittsstelle des *N. ischiadicus* ipsilateral zur Injektion. Im induzierten „neuropathischen Schmerzmodell“ reduzierte sich die WNK3-mRNA-Expression im lumbalen Rückenmark zwei Tage nach dem ipsilateralen Eingriff auf 59 % der Sham-Tiere. Darüber hinaus wurden weder im inflammatorischen noch im „neuropathischen Schmerzmodell“ Proteinexpressionsveränderungen von NKCC1 und KCC2 im vorgegebenen Zeitverlauf festgestellt. Es ergaben sich keine Hinweise für eine regulative Bedeutung von CIP1 und WNK3 auf NKCC1 und KCC2.

Es konnten somit in beiden Schmerzmodellen einzelne Veränderungen bei der Transkription spezifischer Gene beobachtet werden. Deren Translation zeigte dagegen keinerlei Veränderung. Interessant wäre daher die eingehende Untersuchung der Zielproteine auf posttranslationaler Ebene sowie im folgenden Proteintransport zur neuronalen Zellmembran. Durch die Wahl eines modifikationsspezifischen Antikörpers für ein spezifisches Protein in der Western Blot Analyse könnte eine solchartige Modifikation erfasst werden. Für phosphoryliertes NKCC1 wurde ein solch möglicher Zusammenhang im Proteintransport nach Schmerzinduktion bereits ermittelt (GALAN & CERVERO, 2005). Um in den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen phosphoryliertes NKCC1 eingehend zu analysieren, fehlte allerdings ein kommerziell erhältlicher spezifischer Antikörper. Weitere mögliche Einfluss nehmende Faktoren sind die *transducer* Kinasen SPAK und OSR1, die im Zusammenspiel mit WNK3 NKCC1 phosphorylieren könnten (DOWD & FORBUSH, 2003). Auch scheint die Proteinkinase C Einfluss auf die Aktivität von KCC2 nehmen zu können (BLAESSE & NOTHWANG, 2008).

Die *in vitro* festgestellten Wirkungen von CIP1 und WNK3 sind nicht ohne tierexperimentelle Überprüfung auf *in vivo* Bedingungen übertragbar, da artifizielle *in vitro* Bedingungen nicht den Gesamtorganismus als Einflussfaktor berücksichtigen. Weiterführende Erkenntnisse könnten durch Proteinanalyse mittels Western Blot

## Diskussion

oder Immunhistochemie von CIP1 und WNK3 gewonnen werden. Hierfür wären zunächst funktionierende spezifische Antikörper erforderlich, denn die für diese Arbeit getesteten kommerziellen Antikörper wiesen WNK3 in der Western Blot Analyse nicht zuverlässig nach.

Ansätze für die Gewinnung neuer Erkenntnisse zur Chronifizierung neuropathischer und inflammatorischer Schmerzen wären: Die Lokalisation der Phosphorylierungsstellen von NKCC1 und KCC2 und Erfassung mittels spezifischer Antikörper, um ihre verschiedenen Funktionszustände zu verstehen. Außerdem die Identifikation von auf NKCC1 und KCC2 Einfluss nehmender Kinasen und Phosphatasen, um regulative Zusammenhänge zu erkennen. Darüber hinaus wäre die simultane Untersuchung von NKCC1 und KCC2 über zwei Wochen nach CFA- bzw. CCI-Intervention und täglicher Gewinnung des Dorsalorns auf Höhe der Austrittsstelle des *N. ischiadicus* und anschließender Proteinexpressionsanalyse mittels Western Blot oder Immunhistochemie interessant.

## 5 Zusammenfassung

Chronisch inflammatorische und neuropathische Schmerzen beeinflussen die Lebensqualität von Mensch und Tier erheblich. Allerdings ist die effektive Therapie von chronischen Schmerzen oftmals schwierig und unzureichend. Nicht zuletzt auch deshalb, weil die zugrunde liegenden Mechanismen, die zur Entwicklung chronischer Schmerzen führen, bisher nicht ausreichend geklärt sind. Es ist daher notwendig, neue Erkenntnisse über die Entstehungsmechanismen zu gewinnen, um sowohl für die Human- als auch die Tiermedizin eine verbesserte Schmerztherapie ermöglichen zu können.

Bei der Pathogenese chronischer Schmerzen könnten die Kation-Chlorid-Cotransporter NKCC1 und KCC2 eine wichtige Rolle spielen. Die vorliegende Arbeit untersucht Expressionsveränderungen von NKCC1 und von KCC2 und deren möglicher Regulatoren CIP1 und WNK3 nach induzierten chronisch inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen im Zeitverlauf bei Laborratten.

Durch die Injektion von CFA in die *Planta pedis* der linken Hintergliedmaße wurde tierexperimentell inflammatorischer Schmerz sowie neuropathischer Schmerz durch CCI-Operation am linken *N. ischiadicus* induziert. Die Entstehung von mechanischer Allodynie und thermaler Hyperalgesie wurde mittels des Dynamic Plantar Aesthesiometer® und des Plantar Test 7370® an der linken Hinterpfote erfasst, während die Messungen an der rechten Hinterpfote zur intraindividuellen Kontrolle dienten. Zu den vorgegebenen Zeitpunkten wurden Rückenmarksgewebe auf Höhe der Austrittsstelle des *N. ischiadicus* und die lumbalen Spinalganglien (L4-L6) ipsilateral zum durchgeführten Eingriff gewonnen. Die Analyse der mRNA-Expression von NKCC1, KCC2, CIP1 und WNK3 erfolgte mittels rtqPCR im gewonnenen Rückenmark und den gewonnenen Spinalganglien, die Analyse der Proteinexpression von NKCC1, KCC2 und WNK3 wurde mittels Western Blot im gewonnenen Rückenmark durchgeführt.

Im „inflammatorischen Schmerzmodell“ zeigten die CFA-behandelten Tiere bei der Testung auf die Entstehung von mechanischer Allodynie vier Stunden nach der



## Zusammenfassung

Injektion an der linken Hinterpfote eine um 35 % signifikant reduzierte PWT sowie nach zwei Tagen eine um 39 % signifikant erhöhte PWT an der rechten Hinterpfote gegenüber den Sham-Tieren. Bei der Testung auf die Entstehung von thermaler Hyperalgesie zeigten sich nach einem Tag eine um 47 % signifikant erniedrigte, nach zwölf Tagen eine um 19 % signifikant erhöhte PWL an der linken Hinterpfote sowie an der rechten Hinterpfote eine nach einem Tag um 17 % signifikant reduzierte PWL verglichen mit den Sham-Tieren. Im „neuropathischen Schmerzmodell“ wurde bei den CCI-operierten Tieren bei der Testung auf die Entstehung von mechanischer Allodynie einen Tag nach der Operation eine um 22 % und nach zwölf Tagen eine um 41 % signifikant reduzierte PWT gegenüber den Sham-Tieren an der linken Hinterpfote festgestellt. Bei der Testung auf die Entstehung von thermaler Hyperalgesie zeigte sich nach zwei Tagen eine um 27 % und nach zwölf Tagen eine um 47 % signifikant reduzierte PLW gegenüber den Sham-Tieren an der linken Hinterpfote.

Vier Stunden nach CFA-Injektion war die KCC2-mRNA-Expression im Rückenmark auf 30 % des mRNA-Niveaus der Sham-Tiere signifikant reduziert. Nach CCI-Operation war die WNK3-mRNA zwei Tage nach dem Eingriff auf 59 % des mRNA-Niveaus der Sham-Tiere signifikant reduziert.

Bei der Untersuchung der Proteinexpression von NKCC1 und KCC2 waren weder im „inflammatorischen“ noch im „neuropathischen Schmerzmodell“ signifikante Expressionsveränderungen im vorgegebenen Zeitverlauf feststellbar. WNK3 konnte nicht im Western Blot dargestellt werden.

Nach der Injektion von CFA entwickelte sich an der behandelten Pfote innerhalb von 24 Stunden mechanische Allodynie sowie thermale Hyperalgesie, die nach zwölf Tagen in eine, möglicherweise durch neuronale Defunktionalisierung bedingte, Hypalgesie umschlug. An der kontralateralen Pfote waren vermutlich schonhaltungs- und stressbedingte Veränderungen der Schmerzempfindlichkeit feststellbar, bei denen ein transmedianer Effekt von CFA auf die neuronale Signalübertragung der kontralateralen Pfote nicht auszuschließen ist. Nach Durchführung der CCI nahm die Schmerzempfindlichkeit an der behandelten Pfote der Versuchstiere, möglicherweise als Folge des postoperativen Traumas, zu und manifestierte sich anschließend als mechanische Allodynie und thermale Hyperalgesie. Ein Zusammenhang zwischen der Entstehung chronischer Schmerzen und mRNA-Expressionsveränderungen von

## Zusammenfassung

NKCC1 oder Proteinexpressionsveränderungen von NKCC1 und KCC2 konnte nicht erarbeitet werden. KCC2 könnte über eine Reduktion seiner mRNA-Expression an der Entwicklung inflammatorischer Schmerzen beteiligt sein. Ein regulativer Zusammenhang von CIP1-mRNA auf NKCC1 und KCC2 wurde nicht abschließend geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass WNK3 über eine Reduktion seiner mRNA-Expression möglicherweise als Regulator im Zusammenhang mit neuropathischen Schmerzen fungieren könnte.

Für nachfolgende Studien sind weitere Modulationen von NKCC1 und KCC2 in ihrer Expression und Funktion zu berücksichtigen. Dies geschieht möglicherweise durch die Aktivität von WNK1 und WNK4 über OSR1 und SPAK oder die Aktivität der Proteinkinase C mittels Phosphorylierung. Um die Effekte dieser Kinasen als mögliche Regulatoren von NKCC1 und KCC2 zu verstehen, ist es zunächst notwendig, die regulierenden Phosphorylierungsstellen mittels spezifischer Antikörper zu lokalisieren und die Funktionsweise der Kinasen zu erfassen.

## 6 Summary

**The relevance of the Cation-Chloride-Cotransporters NKCC1 and KCC2 and their possible regulators CIP1 and WNK3 for the development of chronic pain. A molecular biological analysis in the lumbal spinal cord and in the lumbal dorsal root ganglia of rats with CFA-induced inflammatory and CCI-induced neuropathic pain.**

Chronic inflammatory and neuropathic pain strongly influence the quality of life of humans and animals. However, the effective therapy of chronic pain often is difficult and insufficient. If nothing else, this is due to the fact that the underlying mechanisms, which drive the development of chronic pain, are not yet fully understood. It is necessary to gain new findings of the underlying mechanisms in order to enable an improved pain therapy in the human and veterinary medicine.

The Cation-Chloride-Cotransporters NKCC1 and KCC2 might play a major role in the pathogenesis of chronic pain. This thesis at hand analyses possible changes of the expression of NKCC1 and KCC2 and their possible regulators CIP1 and WNK3 after induced inflammatory and neuropathic pain in the course of time in laboratory rats.

By CFA-injection in the *Planta pedis* of the left hindpaw inflammatory pain was experimentally induced while neuropathic pain was induced by CCI-operation of the left *N. ischiadicus*. The development of mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were measured by the Dynamic Plantar Aesthesiometer® and the Plantar Test 7370® on the left hindpaw, while measuring the right hindpaw served as an intraindividual control. Samples of the spinal cord on the height of the emergence point of the *N. ischiadicus* and lumbal dorsal root ganglia (L4-L6) were extracted ipsilaterally to the performed intervention in the given course of time. The analysis of the mRNA-expression of NKCC1, KCC2, CIP1 and WNK3 followed by performing rtqPCR of the extracted spinal cord and the extracted dorsal root ganglia plus the analysis of the protein expression of NKCC1, KCC2 and WNK3 by performing a Western Blot analysis of the extracted spinal cord.

## Summary

In the "inflammatory pain model" the CFA-treated animals showed four hours after the injection in the left hindpaw a by 35 % significantly reduced PWT and after two days a by 39 % significantly increased PWT on the right hindpaw compared to the Sham-animals while testing the development of mechanical allodynia. While testing the development of thermal hyperalgesia after one day a by 47 % significantly reduced, after twelve days a by 19 % significantly increased PWL on the left hindpaw plus after one day a by 17 % significantly reduced PWL on the right hindpaw compared to the Sham-animals were shown. In the "neuropathic pain model" while testing the development of mechanical allodynia after one day a by 22 % and after twelve days a by 41 % significantly decreased PWT were discovered on the left hindpaw of the CCI-operated animals compared to the Sham-animals. While testing the development of thermal hyperalgesia after two days a by 27 % and after twelve days a by 47 % significantly reduced PWL on the left hindpaw was shown compared to the Sham-animals.

Four hours after CFA-injection the KCC2-mRNA was significantly decreased down to 30 % of the Sham-animal's KCC2-mRNA level in the spinal cord. After the CCI-operation the WNK3-mRNA was significantly reduced two days after the intervention down to 59 % of the mRNA level of the Sham-animals.

In the analysis of the protein expression of NKCC1 and KCC2 neither in the "inflammatory pain model" nor in the "neuropathic pain model" significant changes in the protein expression levels were detected in the given course of time. WNK3 could not be portrayed in the Western Blot analysis.

After the injection of CFA mechanical allodynia and thermal hyperalgesia developed within 24 hours on the treated paw. After twelve days the thermal hyperalgesia had switched to hypalgesia which might be induced by neuronal defunctionalisation. The contralateral paw showed changes in its sensitivity possibly induced by the animals' guarding posture and stress. A transmedian effect of CFA on the neuronal transmission in the contralateral paw might be possible. After the execution of CCI the pain sensitivity increased in the treated paw, which might be due to postoperative trauma, and developed to mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. A connection between the development of chronic pain and changes in the mRNA-expression of NKCC1 or protein expression of NKCC1 and KCC2 could not be acquired. KCC2 might contribute to the development of inflammatory pain through a

## Summary

reduction of its mRNA-expression. No regulating connection of CIP1-mRNA on NKCC1 and KCC2 was shown. There are indications that WNK3 might act through a reduction of its mRNA-expression as a possible regulator in connection with neuropathic pain.

For succeeding investigations more modulations of NKCC1 and KCC2 concerning their expression and function need to be considered. This might possibly occur due to the activity of WNK1 and WNK4 via OSR1 and SPAK or the activity of the Protein kinase C by phosphorylation. In order to understand the effects of those kinases as possible regulators of NKCC1 and KCC2 it is necessary to localise the regulating positions for the phosphorylation by specific antibodies and to determine the function of the kinases.

## 7 Literaturverzeichnis

- ABBOTT, A., (2004): Laboratory Animals: The Renaissance Rat. *Nature*, **428**, 464–466.
- ABBOTT, F.V., FRANKLIN, K.B. & WESTBROOK, R.F., (1995): The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*, **60**, 91–102.
- AURICH, C. & BAUMGARTNER, W., (2009): Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere, Stuttgart: Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart, 47-49.
- AUSTIN, P.J., WU, A. & MOALEM-TAYLOR, G., (2012): Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (61), pii: 3393, doi 10.3791/3393.
- BAIR, M.J. & SANDERSON, T.R., (2011): Coanalgesics for chronic pain therapy: a narrative review. *Postgraduate Medicine*, **123**, 140–150.
- BARDONI, R., TAKAZAWA, T., TONG, C.-K., CHOUDHURY, P., SCHERRER, G. & MACDERMOTT, A.B., (2013): Pre- and postsynaptic inhibitory control in the spinal cord dorsal horn. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1279**, 90–96.
- BARON, R., (2006): Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nature clinical practice. Neurology*, **2**, 95–106.
- BARON, R., BINDER, A. & WASNER, G., (2010): Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurology*, **9**, 807–819.
- BARTHEL, F., (2012): Zur Bedeutung des Glycin-Transporters GlyT-2 in der Pathogenese und Therapie neuropathischer Schmerzen [vet. med. Dissertation], München.
- BENNETT, G.J. & XIE, Y.K., (1988): A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, **33**, 87–107.
- BLAESSE, P., AIRAKSINEN, M.S., RIVERA, C. & KAILA, K., (2009): Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron*, **61**, 820–838.
- BLAESSE, P. & NOTHWANG, G., (2008): Neuronale Chloridhomöostase: entwicklungs- und aktivitätsabhängige Regulation von Chloridtransportern. *Neuroforum* 1/08, 148-158.
- BLUMBERG, H. & JÄNIG, W., (1984): Discharge pattern of afferent fibers from a neuroma. *Pain*, **20**, 335–353.
- BÖHM-HOFSTÄTTER, H., TSCHERNUTTER, M. & KUNERT, R., (2010): Comparison of hybridization methods and real-time PCR: their value in animal

- cell line characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**, 419–425.
- BONISLAWSKI, D.P., SCHWARZBACH, E.P. & COHEN, A.S., (2007): Brain injury impairs dentate gyrus inhibitory efficacy. *Neurobiology of Disease*, **25**, 163–169.
- BRANDENBURGER, T., CASTOLDI, M., BRENDDEL, M., GRIEVINK, H., SCHLÖSSER, L., WERDEHAUSEN, R., BAUER, I. & HERMANN, H., (2012): Expression of spinal cord microRNAs in a rat model of chronic neuropathic pain. *Neuroscience Letters*, **506**, 281–286.
- BREIVIK, H., COLLETT, B., VENTAFRIDDA, V., COHEN, R. & GALLACHER, D., (2006): Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain (London, England)*, **10**, 287–333.
- BRIDGES, D., THOMPSON, S.W.N. & RICE, A.S.C., (2001): Mechanisms of neuropathic pain. *British Journal of Anaesthesia*, **87**, 12–26.
- BURGESS, P.R. & PERL, E.R., (1967): Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *The Journal of Physiology*, **190**, 541–562.
- CAMPBELL, J.N. & MEYER, R.A., (2006): Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*, **52**, 77–92.
- CARON, L., ROUSSEAU, F., GAGNON, E. & ISENRING, P., (2000): Cloning and functional characterization of a cation-Cl<sup>-</sup> cotransporter-interacting protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 32027–32036.
- CHACUR, M., MILLIGAN, E.D., GAZDA, L.S., ARMSTRONG, C., WANG, H., TRACEY, K.J., MAIER, S.F. & WATKINS, L.R., (2001): A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. *Pain*, **94**, 231–244.
- COSTIGAN, M., SCHOLZ, J. & WOOLF, C.J., (2009): Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annual Review of Neuroscience*, **32**, 1–32.
- COULL, J.A.M., BOUDREAU, D., BACHAND, K., PRESCOTT, S.A., NAULT, F., SÍK, A., KONINCK, P. DE & KONINCK, Y. DE, (2003): Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, **424**, 938–942.
- COUSINS, M.J. & LYNCH, M.E., (2011): The Declaration Montreal: access to pain management is a fundamental human right. *Pain*, **152**, 2673–2674.
- CRAMER, S.W., BAGGOTT, C., CAIN, J., TILGHMAN, J., ALLCOCK, B., MIRANPURI, G., RAJPAL, S., SUN, D. & RESNICK, D., (2008): The role of cation-dependent chloride transporters in neuropathic pain following spinal cord injury. *Molecular Pain*, **4**, 36.

- D'MELLO, R. & DICKENSON, A.H., (2008): Spinal cord mechanisms of pain. *British Journal of Anaesthesia*, **101**, 8–16.
- DARMAN, R.B. & FORBUSH, B., (2002): A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 37542–37550.
- DELORME, C., NAVEZ, M.L., LEGOUT, V., DELEENS, R. & MOYSE, D., (2011): Treatment of neuropathic pain with 5% lidocaine-medicated plaster: Five years of clinical experience. *Pain Research & Management: The Journal of the Canadian Pain Society*, **16**, 259–263.
- DELPIRE, E., LU, J., ENGLAND, R., DULL, C. & THORNE, T., (1999): Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nature Genetics*, **22**, 192–195.
- DJOUHRI, L. & LAWSON, S.N., (2004): Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Research*, **46**, 131–145.
- DONALDSON, L.F., (1999): Unilateral arthritis: contralateral effects. *Trends in Neurosciences*, **22**, 495–496.
- DONALDSON, L.F., SECKL, J.R. & MCQUEEN, D.S., (1993): A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. *Journal of Neuroscience Methods*, **49**, 5–10.
- DOWD, B.F.X. & FORBUSH, B., (2003): PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 27347–27353.
- DRIESSEN, B., BAUQUIER, S.H. & ZARUCCO, L., (2010): Neuropathic pain management in chronic laminitis. *The Veterinary clinics of North America. Equine Practice*, **26**, 315–337.
- DUDEL, J., (1990): Grundlagen der Zellphysiologie. In: SCHMITD, R. F. & THEWS, G.: *Physiologie des Menschen*. 24. Auflage, Berlin, Springer-Verlag, S. 2-19.
- DWORKIN, R.H., (2002): An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms. *The Clinical Journal of Pain*, **18**, 343–349.
- DWORKIN, R.H., BACKONJA, M., ROWBOTHAM, M.C., ALLEN, R.R., ARGOFF, C.R., BENNETT, G.J., BUSHNELL, M.C., FARRAR, J.T., GALER, B.S., HAYTHORNTHWAITE, J.A., HEWITT, D.J., LOESER, J.D., MAX, M.B., SALTARELLI, M., SCHMADER, K.E., STEIN, C., THOMPSON, D., TURK, D.C., WALLACE, M.S., WATKINS, L.R. & WEINSTEIN, S.M., (2003): Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Archives of Neurology*, **60**, 1524–1534.
- DWORKIN, R.H., O'CONNOR, A.B., BACKONJA, M., FARRAR, J.T., FINNERUP, N.B., JENSEN, T.S., KALSO, E.A., LOESER, J.D., MIASKOWSKI, C., NURMIKKO, T.J., PORTENOY, R.K., RICE, A.S.C., STACEY, B.R., TREEDE,



- R.-D., TURK, D.C. & WALLACE, M.S., (2007): Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain*, **132**, 237–251.
- DYCK, P.J., DYCK, P.J., LARSON, T.S., O'BRIEN, P.C. & VELOSA, J.A., (2000): Patterns of quantitative sensation testing of hypoesthesia and hyperalgesia are predictive of diabetic polyneuropathy: a study of three cohorts. Nerve growth factor study group. *Diabetes Care*, **23**, 510–517.
- DZHALA, V.I., TALOS, D.M., SDRULLA, D.A., BRUMBACK, A.C., MATHEWS, G.C., BENKE, T.A., DELPIRE, E., JENSEN, F.E. & STALEY, K.J., (2005): NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nature Medicine*, **11**, 1205–1213.
- ELLIS, A. & BENNETT, D.L.H., (2013): Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *British Journal of Anaesthesia*, **111**, 26–37.
- FANG, J.-F., LIANG, Y., DU, J.-Y. & FANG, J.-Q., (2013): Transcutaneous electrical nerve stimulation attenuates CFA-induced hyperalgesia and inhibits spinal ERK1/2-COX-2 pathway activation in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **13**, 134.
- FELDMAN, H.S. & COVINO, B.G., (1988): Comparative motor-blocking effects of bupivacaine and ropivacaine, a new amino amide local anesthetic, in the rat and dog. *Anesthesia and Analgesia*, **67**, 1047–1052.
- FINNERUP, N.B., OTTO, M., MCQUAY, H.J., JENSEN, T.S. & SINDRUP, S.H., (2005): Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain*, **118**, 289–305.
- FREY, M. von, (1896): Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. 1. Abhandlung: Druckempfindung und Schmerz, Leipzig, S. Hirzel.
- FREY, H. H., LÖSCHER, W., (2005): Zentrales Nervensystem; In: ENGELHARDT, W. von & BREVES, G. (Hrg.): Physiologie der Haustiere, 2. Auflage, Stuttgart, Enke Verlag, 43-67.
- FREYNHAGEN, R. & BENNETT, M.I., (2009): Diagnosis and management of neuropathic pain. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, **339**, b3002.
- GALAN, A. & CERVERO, F., (2005): Painful stimuli induce in vivo phosphorylation and membrane mobilization of mouse spinal cord NKCC1 co-transporter. *Neuroscience*, **133**, 245–252.
- GAMBA, G., (2005): Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiological Reviews*, **85**, 423–493.
- GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J. & DAVID, M.M., (1949): Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, **177**, 751–766.
- GRUBB, T., (2010): Chronic neuropathic pain in veterinary patients. *Topics in Companion Animal Medicine*, **25**, 45–52.

- HAAS, M., MCBRAYER, D. & LYTLE, C., (1995): [Cl<sup>-</sup>]-dependent phosphorylation of the Na-K-Cl cotransport protein of dog tracheal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 28955–28961.
- HAGGARD, P., IANNETTI, G.D. & LONGO, M.R., (2013): Spatial sensory organization and body representation in pain perception. *Current Biology: CB*, **23**, R164–176.
- HARGREAVES, K., DUBNER, R., BROWN, F., FLORES, C. & JORIS, J., (1988): A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, **32**, 77–88.
- HARRIS, J.A., CORSI, M., QUARTAROLI, M., ARBAN, R. & BENTIVOGLIO, M., (1996): Upregulation of spinal glutamate receptors in chronic pain. *Neuroscience*, **74**, 7–12.
- HASBARGEN, T., AHMED, M.M., MIRANPURI, G., LI, L., KAHLE, K.T., RESNICK, D. & SUN, D., (2010): Role of NKCC1 and KCC2 in the development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1198**, 168–172.
- HASENFUSS, G., (1998): Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular Research*, **39**, 60–76.
- HECKE, O. VAN, AUSTIN, S.K., KHAN, R.A., SMITH, B.H. & TORRANCE, N., (2013): Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain*, pii: S0304-3959 (13) 00610-6. doi: 10.1016/j.pain.2013. 11.013. [Epub ahead of print]
- HERMANN, H., MUTH-SELBACH, U., LIPFERT, P., BRAUN, S., WERDEHAUSEN, R. & BAUER, I., (2009): Loss of spinal glycinergic neurons is not necessary for development of neuropathic pain in transgenic mice expressing enhanced green fluorescent protein in glycinergic neurons. *Neuroscience*, **159**, 1148–1153.
- HOGAN, Q., (2002): Animal pain models. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, **27**, 385–401.
- HOLZAPFEL, B., WICKERT, L., (2007): Methoden und Anwendungsgebiete: Die quantitative realtime PCR. *Biologie Unserer Zeit*, **37**, 120-126.
- HUANG, C.-P., CHEN, H.-N., SU, H.-L., HSIEH, C.-L., CHEN, W.-H., LAI, Z.-R. & LIN, Y.-W., (2013): Electroacupuncture Reduces Carrageenan- and CFA-Induced Inflammatory Pain Accompanied by Changing the Expression of Nav1.7 and Nav1.8, rather than Nav1.9, in Mice Dorsal Root Ganglia. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, **2013**, 312184.
- HÜBNER, C.A. & HOLTHOFF, K., (2013): Anion transport and GABA signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **7**, 177.

- HÜBNER, C.A., STEIN, V., HERMANS-BORGMEYER, I., MEYER, T., BALLANYI, K. & JENTSCH, T.J., (2001): Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron*, **30**, 515–524.
- HUSKAMP, B., (2006): Intensivmedizin. In: DIETZ, O. & HUSKAMP, B.: Handbuch Pferdepraxis. 3. Auflage, Stuttgart, Enke, 197-199.
- INOUE, K., (2006): The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacology & Therapeutics*, **109**, 210–226.
- KAHLE, K.T., DEEB, T.Z., PUSKARJOV, M., SILAYEVA, L., LIANG, B., KAILA, K. & MOSS, S.J., (2013): Modulation of neuronal activity by phosphorylation of the K-Cl cotransporter KCC2. *Trends in Neurosciences*, **36** (12): 726-37. doi: 10.1016/j.tins.2013.08.006. [Epub 2013 Oct]
- KAHLE, K.T., RINEHART, J. & LIFTON, R.P., (2010): Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1802**, 1150–1158.
- KAHLE, K.T., RINEHART, J., LOS HEROS, P. DE, LOUVI, A., MEADE, P., VAZQUEZ, N., HEBERT, S.C., GAMBA, G., GIMENEZ, I. & LIFTON, R.P., (2005): WNK3 modulates transport of Cl<sup>-</sup> in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 16783–16788.
- KAHLE, K.T., RINEHART, J., RING, A., GIMENEZ, I., GAMBA, G., HEBERT, S.C. & LIFTON, R.P., (2006): WNK protein kinases modulate cellular Cl<sup>-</sup> flux by altering the phosphorylation state of the Na-K-Cl and K-Cl cotransporters. *Physiology (Bethesda, Md.)*, **21**, 326–335.
- KAHLE, K.T. & STALEY, K.J., (2008): The bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 as a potential target of a novel mechanism-based treatment strategy for neonatal seizures. *Neurosurgical Focus*, **25**, E22.
- KANAAN, S.A., POOLE, S., SAADÉ, N.E., JABBUR, S. & SAFIEH-GARABEDIAN, B., (1998): Interleukin-10 reduces the endotoxin-induced hyperalgesia in mice. *Journal of Neuroimmunology*, **86**, 142–150.
- KHAN, S., SHEHZAD, O., CHUN, J. & KIM, Y.S., (2013): Mechanism underlying anti-hyperalgesic and anti-allodynic properties of anomalin in both acute and chronic inflammatory pain models in mice through inhibition of NF-κB, MAPKs and CREB signaling cascades. *European Journal of Pharmacology*, **718** (1-3): 448-58. doi: 10.1016/j.ejphar. 2013.07.039. [Epub 2013 Jul 30]
- KHIRUG, S., YAMADA, J., AFZALOV, R., VOIPIO, J., KHIROUG, L. & KAILA, K., (2008): GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 4635–4639.
- KIM, S.H. & CHUNG, J.M., (1992): An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, **50**, 355–363.

- KOHNO, T., JI, R.-R., ITO, N., ALLCHORNE, A.J., BEFORT, K., KARCHEWSKI, L.A. & WOOLF, C.J., (2005): Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. *Pain*, **117**, 77–87.
- KOLTZENBURG, M., WALL, P.D. & MCMAHON, S.B., (1999): Does the right side know what the left is doing? *Trends in Neurosciences*, **22**, 122–127.
- KWON, M., ALTIN, M., DUENAS, H. & ALEV, L., (2013): The Role of Descending Inhibitory Pathways on Chronic Pain Modulation and Clinical Implications. *Pain Practice: the Official Journal of World Institute of Pain*, doi: 10.1111/papr.12145. [Epub ahead of print]
- LAEMMLI, U.K., (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- LATREMOLIERE, A. & WOOLF, C.J., (2009): Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society*, **10**, 895–926.
- LI, C.-Y., SONG, Y.-H., HIGUERA, E.S. & LUO, Z.D., (2004): Spinal dorsal horn calcium channel  $\alpha_2\delta$ -1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 8494–8499.
- LIU, C.N., WALL, P.D., BEN-DOR, E., MICHAELIS, M., AMIR, R. & DEVOR, M., (2000): Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain*, **85**, 503–521.
- LIU, N.-K. & XU, X.-M., (2006): beta-tubulin is a more suitable internal control than beta-actin in western blot analysis of spinal cord tissues after traumatic injury. *Journal of Neurotrauma*, **23**, 1794–1801.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J., (1951): Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265–275.
- MAAG, R., STENGEL, M. & BARON, P.D.R., (2006): Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen. *Der Diabetologe*, **2**, 104–113.
- MAIHÖFNER, C., SCHMELZ, M., FORSTER, C., NEUNDÖRFER, B. & HANDWERKER, H.O., (2004): Neural activation during experimental allodynia: a functional magnetic resonance imaging study. *The European Journal of Neuroscience*, **19**, 3211–3218.
- MAO, S., GARZON-MUVDI, T., FULVIO, M.D., CHEN, Y., DELPIRE, E., ALVAREZ, F.J. & ALVAREZ-LEEFMANS, F.J., (2012): Molecular and functional expression of cation-chloride cotransporters in dorsal root ganglion neurons during postnatal maturation. *Journal of Neurophysiology*, **108**, 834–852.
- MELZACK, R. & WALL, P.D., (1965): Pain mechanisms: a new theory. *Science (New York, N.Y.)*, **150**, 971–979.

- MERSKEY, H. & BOGDUK, N. (1994): Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms, 2nd edn., IASP Press, Seattle. WA.
- MILETIC, G. & MILETIC, V., (2008): Loose ligation of the sciatic nerve is associated with TrkB receptor-dependent decreases in KCC2 protein levels in the ipsilateral spinal dorsal horn. *Pain*, **137**, 532–539.
- MOGIL, J.S., DAVIS, K.D. & DERBYSHIRE, S.W., (2010): The necessity of animal models in pain research. *Pain*, **151**, 12–17.
- MOORE, K.A., KOHNO, T., KARCHEWSKI, L.A., SCHOLZ, J., BABA, H. & WOOLF, C.J., (2002): Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **22**, 6724–6731.
- MORALES-AZA, B.M., CHILLINGWORTH, N.L., PAYNE, J.A. & DONALDSON, L.F., (2004): Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. *Neurobiology of Disease*, **17**, 62–69.
- NABEKURA, J., UENO, T., OKABE, A., FURUTA, A., IWAKI, T., SHIMIZU-OKABE, C., FUKUDA, A. & AKAIKE, N., (2002): Reduction of KCC2 expression and GABAA receptor-mediated excitation after in vivo axonal injury. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **22**, 4412–4417.
- NOGUCHI, K., DUBNER, R., LEON, M. DE, SENBA, E. & RUDA, M.A., (1994): Axotomy induces preprotachykinin gene expression in a subpopulation of dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience Research*, **37**, 596–603.
- NOMURA, H., SAKAI, A., NAGANO, M., UMINO, M. & SUZUKI, H., (2006): Expression changes of cation chloride cotransporters in the rat spinal cord following intraplantar formalin. *Neuroscience Research*, **56**, 435–440.
- OKAMOTO, K., MARTIN, D.P., SCHMELZER, J.D., MITSUI, Y. & LOW, P.A., (2001): Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Experimental Neurology*, **169**, 386–391.
- PARKER, J.C., (1993): In defense of cell volume? *The American Journal of Physiology*, **265**, C1191–1200.
- PAYNE, J.A. & FORBUSH, B., 3rd, (1995): Molecular characterization of the epithelial Na-K-Cl cotransporter isoforms. *Current Opinion in Cell Biology*, **7**, 493–503.
- PAYNE, J.A., RIVERA, C., VOIPIO, J. & KAILA, K., (2003): Cation–chloride cotransporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends in Neurosciences*, **26**, 199–206.

- PAYNE, J.A., STEVENSON, T.J. & DONALDSON, L.F., (1996): Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 16245–16252.
- PFAFFL, M.W., (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**, e45.
- PFAFFL, M.W., HORGAN, G.W. & DEMPFLER, L., (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, **30**, e36.
- PFAFFL, M. W., (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum 2004, Sonderausgabe PCR*, 10:92-5.
- PILLER, N., DECOSTERD, I. & SUTER, M.R., (2013): Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction reference genes in the spared nerve injury model of neuropathic pain: validation and literature search. *BioMed Central Research Notes*, **6**, 266.
- PLOTKIN, M.D., KAPLAN, M.R., PETERSON, L.N., GULLANS, S.R., HEBERT, S.C. & DELPIRE, E., (1997): Expression of the Na(+)-K(+)-2Cl<sup>-</sup> cotransporter BSC2 in the nervous system. *The American Journal of Physiology*, **272**, C173–183.
- PONCE-CORIA, J., SAN-CRISTOBAL, P., KAHLE, K.T., VAZQUEZ, N., PACHECO-ALVAREZ, D., LOS HEROS, P. DE, JUÁREZ, P., MUÑOZ, E., MICHEL, G., BOBADILLA, N.A., GIMENEZ, I., LIFTON, R.P., HEBERT, S.C. & GAMBA, G., (2008): Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 8458–8463.
- PORRECA, F., BURGESS, S.E., GARDELL, L.R., VANDERAH, T.W., MALAN, T.P., Jr, OSSIPOV, M.H., LAPPI, D.A. & LAI, J., (2001): Inhibition of neuropathic pain by selective ablation of brainstem medullary cells expressing the mu-opioid receptor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **21**, 5281–5288.
- PRICE, T.J., CERVERO, F., GOLD, M.S., HAMMOND, D.L. & PRESCOTT, S.A., (2009): Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Research Reviews*, **60**, 149–170.
- PRICE, T.J., CERVERO, F. & KONINCK, Y. DE, (2005): Role of Cation-Chloride-Cotransporters (CCC) in Pain and Hyperalgesia. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **5**, 547–555.
- RAHMAN, W. & DICKENSON, A.H., (2013): Voltage gated sodium and calcium channel blockers for the treatment of chronic inflammatory pain. *Neuroscience Letters*, **557**, 19–26.
- RAJA, S.N., TREEDE, R.D., DAVIS, K.D. & CAMPBELL, J.N., (1991): Systemic alpha-adrenergic blockade with phentolamine: a diagnostic test for sympathetically maintained pain. *Anesthesiology*, **74**, 691–698.

- RANDALL, L.O. & SELITTO, J.J., (1957): A method for measurement of of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, **111**:409-419.
- REN, K. & DUBNER, R., (1999): Inflammatory Models of Pain and Hyperalgesia. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, **40**, 111–118.
- RINEHART, J., KAHLE, K.T., HEROS, P. DE LOS, VAZQUEZ, N., MEADE, P., WILSON, F.H., HEBERT, S.C., GIMENEZ, I., GAMBA, G. & LIFTON, R.P., (2005): WNK3 kinase is a positive regulator of NKCC2 and NCC, renal cation-Cl<sup>-</sup> cotransporters required for normal blood pressure homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 16777–16782.
- RIVERA, C., VOIPIO, J., PAYNE, J.A., RUUSUVUORI, E., LAHTINEN, H., LAMSA, K., PIRVOLA, U., SAARMA, M. & KAILA, K., (1999): The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, **397**, 251–255.
- RUSSE, O.Q., MÖSER, C.V., KYNAST, K.L., KING, T.S., STEPHAN, H., GEISSLINGER, G. & NIEDERBERGER, E., (2013): Activation of the AMP-Activated Protein Kinase Reduces Inflammatory Nociception. *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*, **14**, 1330–1340.
- RYTZ, U., (2004): Wunde, Wundheilung. In: KRAMER, M.: *Kompandium der allgemeinen Veterinärchirurgie*. 1. Auflage, Hannover, Schlütersche Verlagsgesellschaft, S. 274-277
- SANN, H., (2005): Nozizeption und Schmerz; In: ENGELHARDT, W. von & BREVES, G. (Hrg.): *Physiologie der Haustiere*, 2. Auflage, Stuttgart, Enke Verlag, 74-79.
- SARZI-PUTTINI, P., VELLUCCI, R., ZUCCARO, S.M., CHERUBINO, P., LABIANCA, R. & FORNASARI, D., (2012): The appropriate treatment of chronic pain. *Clinical drug investigation*, **32 Suppl 1**, 21–33.
- SCHAIBLE, P.D.H.-G., (2007): Pathophysiologie des Schmerzes. *Der Orthopäde*, **36**, 8–16.
- SCHMIDT, M.J., ROTH, J., ONDREKA, N., KRAMER, M. & RUMMEL, C., (2013): A potential role for substance P and interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of Cavalier King Charles Spaniels with neuropathic pain. *American College of Veterinary Internal Medicine*, **27**, 530–535.
- SCHRÖDER, B., DIENER, M., (2005): Grundlagen der Zellphysiologie; In: ENGELHARDT, W. von & BREVES, G. (Hrg.): *Physiologie der Haustiere*, 2. Auflage, Stuttgart, Enke Verlag, 5-21.
- SCHRÖDER, B., SCHEMANN, M., (2005): Allgemeine Neurophysiologie; In: ENGELHARDT, W. von & BREVES, G. (Hrg.): *Physiologie der Haustiere*, 2. Auflage, Stuttgart, Enke Verlag, 22-42.

- SCHÜTZ, S.G. & ROBINSON-PAPP, J., (2013): HIV-related neuropathy: current perspectives. *Human Immunodeficiency Virus/ Acquired Immunodeficiency Syndrom* (Auckland, N.Z.), **5**, 243–251.
- SELTZER, Z., DUBNER, R. & SHIR, Y., (1990): A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, **43**, 205–218.
- SHARMA, S.K., VIJ, A.S. & SHARMA, M., (2013): Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *European Journal of Pharmacology*, 720 (1-3): 55-62, doi: 10.1016/j.ejphar.2013.10.053. [Epub 2013 Nov 5.]
- SHEARER, J.K., STOCK, M.L., AMSTEL, S.R. VAN & COETZEE, J.F., (2013): Assessment and management of pain associated with lameness in cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, **29**, 135–156.
- SIVILOTTI, L.G., THOMPSON, S.W. & WOOLF, C.J., (1993): Rate of rise of the cumulative depolarization evoked by repetitive stimulation of small-caliber afferents is a predictor of action potential windup in rat spinal neurons in vitro. *Journal of Neurophysiology*, **69**, 1621–1631.
- SOLARO, C., TRABUCCO, E. & MESSMER UCCELLI, M., (2013): Pain and multiple sclerosis: pathophysiology and treatment. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, **13**, 320.
- SORKIN, L.S., XIAO, W.H., WAGNER, R. & MYERS, R.R., (1997): Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience*, **81**, 255–262.
- STASHAK, T.S., (2010): *Adams' Lahmheit bei Pferden*. 4. Auflage, Hannover, M & H Schaper, 100-156.
- SUNG, K.W., KIRBY, M., MCDONALD, M.P., LOVINGER, D.M. & DELPIRE, E., (2000): Abnormal GABAA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, **20**, 7531–7538.
- TIZARD, I.R., (2004): *Veterinary immunology: an introduction*. 7. Auflage, Philadelphia, Elsevier/ Saunders, 10-48.
- TREEDE, R.-D., JENSEN, T.S., CAMPBELL, J.N., CRUCCU, G., DOSTROVSKY, J.O., GRIFFIN, J.W., HANSSON, P., HUGHES, R., NURMIKKO, T. & SERRA, J., (2008): Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*, **70**, 1630–1635.
- UVAROV, P., LUDWIG, A., MARKKANEN, M., PRUUNSILD, P., KAILA, K., DELPIRE, E., TIMMUSK, T., RIVERA, C. & AIRAKSINEN, M.S., (2007): A novel N-terminal isoform of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 30570–30576.
- VANHATALO, S., PALVA, J.M., ANDERSSON, S., RIVERA, C., VOIPIO, J. & KAILA, K., (2005): Slow endogenous activity transients and developmental expression



- of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter 2 in the immature human cortex. *The European Journal of Neuroscience*, **22**, 2799–2804.
- VIBAT, C.R., HOLLAND, M.J., KANG, J.J., PUTNEY, L.K. & O'DONNELL, M.E., (2001): Quantitation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransport splice variants in human tissues using kinetic polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, **298**, 218–230.
- VIERCK, C.J., HANSSON, P.T. & YEZIERSKI, R.P., (2008): Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing? *Pain*, **135**, 7–10.
- WENZ, M., HARTMANN, A.-M., FRIAUF, E. & NOTHWANG, H.G., (2009): CIP1 is an activator of the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **381**, 388–392.
- WILLIAMS, J.R., SHARP, J.W., KUMARI, V.G., WILSON, M. & PAYNE, J.A., (1999): The neuron-specific K-Cl cotransporter, KCC2. Antibody development and initial characterization of the protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 12656–12664.
- WU, L.-A., HUANG, J., WANG, W., WANG, W., WANG, X.-J. & WU, S.-X., (2009): Down-regulation of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> co-transporter 2 in mouse medullary dorsal horn contributes to the formalin-induced inflammatory orofacial pain. *Neuroscience Letters*, **457**, 36–40.
- XU, Q. & YAKSH, T.L., (2011): A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus neuropathic pain. *Current Opinion in Anaesthesiology*, **24**, 400–407.
- YAN, Y., DEMPSEY, R.J. & SUN, D., (2001): Expression of Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-Cl<sup>(-)</sup> cotransporter in rat brain during development and its localization in mature astrocytes. *Brain Research*, **911**, 43–55.
- YOSHIMURA, M. & YONEHARA, N., (2006): Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain. *Neuroscience Research*, **56**, 21–28.
- ZEILHOFER, H.U., WILDNER, H. & YÉVENES, G.E., (2012): Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiological Reviews*, **92**, 193–235.
- ZHANG, W., LIU, L.-Y. & XU, T.-L., (2008): Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience*, **152**, 502–510.
- ZHANG, X., HU, L., YIN, J., MO, Z. & CHEN, J., (2002): Rat model of erectile dysfunction caused by cavernous nerve ablation. *Chinese Medical Journal*, **115**, 1179–1182.

## 8 Anhang

### 8.1 Pain-Score

Tab. 14: Pain-Score

Projektnummer: G358/10		Datum		Versuchsgruppe					
Punkte	KGW-Abnahme in %	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID
0	0								
1	0-10								
2	11-20								
3	>20								
<b>Pflegezustand, Fell</b>									
0	glatt, glänzend, anliegend								
1	struppig, matt, ggr. Brillenbildung								
2	struppig, matt, mgr. Brillenbildung								
3	struppig, matt, hgr. Brillenbildung								
<b>Hydratationszustand</b>									
0	Fell glatt, glänzend, anliegend, physiolog. Hautelastizität								
1	ggr. Piloerection, HE ggr. vermindert								
2	mgr. Piloerection, HE mgr. vermindert								
3	hgr. Piloerection, HE hgr. vermindert								
<b>Automutilation</b>									
0	nicht vorhanden								
1	ggr. A., wunde Stellen an der Pfote								
2	mgr. A., abgeissene Krallen								
3	hgr. Automutilation								
<b>Gang &amp; Haltung in Bewegung</b>									
0	physiologisch								
1	ggr. Lahmheit/ Lähmung, leichte Belastung d. Glm.								
2	mgr. Lahmheit/ Lähmung, kaum Belastung d. Glm.								
3	hgr. Lahmheit/ Lähmung, keine Belastung d. Glm.								
<b>Gesamt Pain Score, Habitus</b>									
0	physiologisch, gesundes Tier								
1	ggr. Abweichung/ beeinträchtigt								
2	mgr. Abweichung/ beeinträchtigt								
3	hgr. Abweichung/ beeinträchtigt								

Mittels des Pain-Score wurde jedes Tier vor jeder Verhaltenstestung und jedem Eingriff untersucht (modifiziert nach BARTHEL, 2012); ID = Identitätsnummer der Versuchstiere.

## 8.2 Chemikalienverzeichnis

3-MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aqua destillata	Apotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Coomassie Blue</i>	Serva, Heidelberg, Deutschland
CuSO <sub>4</sub> (Kupfersulfat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Dried skimmed milk</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eisessig, 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, unvergällt, 75 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Folins Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formaldehyd, 37 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol, 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mercaptoethanol	Fluka, Steinheim, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Natriumcarbonat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
PAA (Polyacrylamid), 30 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Sigma 7-9 <sup>®</sup> , Tris base	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

## Anhang

Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Stickstoff	Linde AG, Düsseldorf, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl (Tris hydrochloride)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween	Merck, Darmstadt, Deutschland

## 9 Danksagung

Zahlreiche Personen haben zur Verwirklichung der vorliegenden Arbeit beigetragen. Ihnen allen gilt mein Dank für Ihre Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Manfred Stangassinger, Lehrstuhl für Physiologie am Veterinärwissenschaftlichen Departement der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, gebührt mein besonderer Dank für seine ausführliche und freundliche Betreuung sowie die Förderung tierärztlicher Aspekte in dieser Arbeit.

Am Ort der Durchführung meiner Arbeit, der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, danke ich folgenden Mitarbeitern: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Inge Bauer, Laborleiterin der experimentellen Anästhesie und meine Betreuerin, für ihre weitsichtige Unterstützung, den Ansporn sowie ihr stets offenes Ohr und die offene Tür in jedem einzelnen Arbeitsabschnitt; Herrn Dr. med. Henning Hermanns, Versuchs- und Arbeitsgruppenleiter, für die Förderung dieser Arbeit auf wissenschaftlicher und methodischer Ebene und für seine kompetente Beratung; Herrn Dr. med. Lukas Schlösser für die Möglichkeit, dieses bemerkenswerte Thema experimentell vertiefen zu können, seine souveräne Betreuung und zuverlässige Erreichbarkeit zu jeder Zeit; Frau Yvonne Grüber, Frau Claudia Dohle und Frau Antje Nebert für meine gründliche Einarbeitung im Labor und die weitere fachliche Unterstützung; Frau Dr. med. vet. Franziska Barthel für ihren engagierten Zuspruch und für qualifizierte Hinweise zur tierexperimentellen und laboranalytischen Durchführung meiner Arbeit; bei allen Mitarbeitern der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die zuverlässige Beratung und Kooperation.

Herzlicher Dank geht natürlich an meinen Mann, Dr.-Ing. Matthias Buhl, für Motivation, Rückhalt, uneingeschränkten Zuspruch und seine Liebe.

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet. Ich danke Ihnen von ganzem Herzen für Ihre liebevolle Unterstützung und die großzügige Ermöglichung meiner akademischen Ausbildung.